



# Caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal et développement d'une stratégie de restauration par voie enzymatique

Eleonore Izquierdo

## ► To cite this version:

Eleonore Izquierdo. Caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal et développement d'une stratégie de restauration par voie enzymatique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Cergy Pontoise, 2015. Français. <NNT : 2015CERG0780>. <tel-01347102>

**HAL Id: tel-01347102**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01347102>**

Submitted on 20 Jul 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur  
De l'Université de Cergy-Pontoise  
Ecole doctorale science et ingénierie

Domaine : Science de la Vie et de la Santé  
Spécialité : Biochimie

## Caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal et développement d'une stratégie de restauration par voie enzymatique

Par Eléonore IZQUIERDO

Au sein de :

- Equipe de Recherche sur les Relations Matrices Extracellulaires-Cellules, EA 1391
- Centre de Recherche sur la Conservation des Collections, MNHN-USR 3224

Soutenance prévue le 16 décembre 2015  
Devant un jury composé de :

Thibaud Coradin	Docteur, Collège de France	Rapporteur
Didier Le Cerf	Professeur, Université de Rouen	Rapporteur
Lucretia Miu	Docteur, ICPI laboratory	Examineur
Véronique Larreta-Garde	Professeur, Université de Cergy-Pontoise	Directrice de thèse
Bertrand Lavédrine	Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle	Co-directeur de thèse
Michel Boissière	Docteur, Université de Cergy-Pontoise	Encadrant-invité
Laurianne Robinet	Docteur, Muséum National d'Histoire Naturelle	Encadrante-invitée
Claire Chahine	Docteur	Experte-invitée

# Remerciements

---

Ces travaux ont été réalisés en codirection entre le laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule), dans le groupe thématique des Biomatériaux pour la Santé (BioSan) à l'Université de Cergy-Pontoise et entre le laboratoire du CRC (Centre de Recherche sur la Conservation), au sein de l'équipe CRCC (Centre de Recherche sur la Conservation des Collections) au Muséum National d'Histoire Naturelle.

Cette étude a été effectuée grâce au financement du LabEx Patrima – Fondation des Sciences du Patrimoine.

Mes profonds remerciements au Professeur Didier LE CERF et au Docteur Thibaud CORADIN, mes deux rapporteurs, pour avoir accepté de juger ce travail. Un grand merci également au Docteur Lucretia MIU pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Je remercie également le Docteur Claire CHAHINE pour avoir accepté notre invitation.

Je vous remercie pour vos remarques et les discussions très enrichissantes qui ont eu lieu lors de la soutenance.

Je remercie les deux directeurs successifs du laboratoire ERRMECe, les Professeurs Véronique LARRETA-GARDE et Olivier GALLET pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je remercie également le Professeur Bertrand LAVEDRINE pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire du CRCC.

Mes plus sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse le Professeure Véronique LARRETA-GARDE et le Professeur Bertrand LAVEDRINE pour m'avoir accordé leur confiance en me proposant ce travail. Je remercie également mes deux encadrants le Docteur Michel BOISSIERE et le Docteur Laurianne ROBINET. Merci à tous de m'avoir aidée et guidée tout au long de ce travail, merci pour vos encouragements dans les moments difficiles, pour vos conseils, vos avis ainsi que vos remarques qui m'ont permis d'avancer tout au long de cette thèse.

Je remercie Monsieur BAUCE de la société TRIMADEL, pour son don gracieux des différents produits d'entretien des cuirs que nous avons testés et pour nous avoir fourni une émulsion faite à façon pour notre étude.

Je tiens à remercier les Professeurs Olivier GALLET et Emmanuel PAUTHE, présents lors des balbutiements de ce projet, pour leur aide, leur présence et leurs conseils.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire ERRMECe pour leur gentillesse, leur proximité, leur bonne humeur, leur accessibilité, leur bienveillance ainsi que pour leur décontraction lors d'évènements tels que la K'ERRMECe, sans oublier bien sûr notre secrétaire, tata Isa sans qui tout serait beaucoup plus compliqué.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du groupe BioSan, pour leur présence et leurs précieux conseils tout au long de ce travail. Je remercie le Docteur Adeline GAND pour ses précieux conseils, son aide et sa confiance pour les enseignements.

Je tiens également à remercier le Professeur Patrick DI MARTINO ainsi que les Docteurs Damien SEYER et Agnès MIHAJLOVSKI pour avoir contribué à ce projet, pour leur aide et le prêt de matériel. Je remercie également Rémy AGNIEL pour son aide et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier le Docteur Sabrina KELLOUCHE pour sa gentillesse, ses conseils, sa bienveillance et ses encouragements. Je remercie le Docteur Cédric PICOT pour ses paroles bienveillantes et ses conseils lors de mes années passées au sein du laboratoire et également Lamia, pour sa bienveillance, son aide et son soutien et les bons moments passés en sa compagnie.

Je tiens à remercier mes « collègues de bureau » pour leur soutien, leur patience, leur bonne humeur et nos moments de rigolades et de décompression. Je tiens tout particulièrement à remercier Lyvia, Elodie et Rümeysa pour nos échanges complices et merci « *Girafe* » pour nous avoir redonné le sourire à de nombreuses occasions. Je remercie également Mathieu, Thomas, Audrey ainsi que Marie et Julie pour leur présence et pour les bons moments passés ensemble, nos pauses « chocolat », thé et pour leur aide lors de nos nombreuses « discussions manips », sans oublier Vanessa, Marisol et Rayane, pour les bons moments passés en leur compagnie lors de leurs venues.

Je tiens à remercier grandement Arnaud BOITTIAUX, pour son aide de tous les instants en manip, sa gentillesse et sa patience, Noémie EIN-ELI pour ses conseils, sa bonne humeur et son aide concernant les enseignements. Je tiens également à remercier la Prépa bio, Caroline, Karine, Bruno et Céline pour leur aide

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du CRCC pour leur accueil, leur gentillesse et leurs paroles bienveillantes, et plus particulièrement Christine CAPEDEROU pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa bienveillance, Mylène BERTHIER & Alban FOURNIER pour leur entrain et leur gentillesse. Je tiens remercier tout particulièrement Oulfa BELHADJ pour sa gentillesse, sa patience, sa pédagogie et pour m'avoir permis d'obtenir de belles images de microscopie à balayage ; Sylvie THAO et Sabrina PARIS pour leur gentillesse et leurs conseils précieux.

Je remercie aussi les doctorants du CRCC et plus particulièrement Giliane, Camille, Sophie et Fabien pour leurs discussions et leur soutien entre doctorants.

Je tiens également à remercier les Professeurs Frédéric VIDAL et Odile FICHET pour avoir accepté ma présence au sein de leur laboratoire, le LPPI. Je remercie l'ensemble des membres du LPPI pour leur accueil. Je tiens plus particulièrement à remercier vivement le Docteur Cédric VANCAEYZEELE pour son aide concernant la DMA, sa gentillesse et ses nombreux conseils ; le Docteur Layla BEOUCH pour sa bienveillance, sa gentillesse et son aide concernant la TGA et la DSC, ainsi que le Docteur Séverine ALFONSI. Je remercie également le Professeur Sophie CANTIN RIVIERE pour sa gentillesse et son aide concernant les mesures d'angles de contact/mouillabilité. Je remercie aussi le Professeur Fabrice GOUBARD, pour nos échanges très intéressants, notamment lors des séminaires Patrima, les Docteurs Xavier SALLENAVE, Sébastien PERALTA et Alaé EL-HAITAMI pour leurs moments d'échanges. Je tiens également à remercier l'ensemble des doctorants et ingénieurs du LPPI : Camille, Mickaël, Adelyne, Vincent, Arnaud, Gwendoline, Adeline, Charlotte C., Amélie, Charlotte L., Thomas, Houssam, Sarah, Adrien, Sébastien pour les bons moments que j'ai passé en leur compagnie

Je tiens également à remercier vivement Annelyse COUSTURE du laboratoire L2MGC pour son aide concernant la microscopie électronique à balayage et les analyses ATD-ATG. Je la remercie également pour sa grande aide à l'analyse des résultats obtenus, pour sa gentillesse, son écoute et sa bienveillance.



Je tiens également à remercier les membres PATRIMA, Emmanuel POIRault, les Docteurs Romain THOMAS et Anne-Julie ETTER ainsi que les doctorants PATRIMA pour leur gentillesse et leur point de vue très intéressant débattu lors des séminaires PATRIMA.

Je remercie également Coralie BARBE et Florence MALO, restauratrices de métier de nous avoir accueillis et fait découvrir leurs techniques de restauration.

Un grand merci également aux Docteurs Lucretia MIU, Petru BUDRUGEAC, Andrei CUCOS et à Ciprian CHELARU et Cristina CARSOTE, pour leur partage des connaissances sur le cuir, leur accueil très chaleureux

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail aussi bien sur le plan scientifique que personnel.

Enfin je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien qui m'a permis de garder le moral et la bonne humeur tout au long de cette expérience.

# Résumé

---

L'exposition à la chaleur, notamment lors d'incendies est particulièrement dévastatrice et dans le cas d'objets du patrimoine elle entraîne la destruction de tout ou partie de ces témoins du passé. Notre étude porte sur les effets de la chaleur sur le cuir, matériau largement présent dans les collections patrimoniales.

A ce jour, aucune méthode de restauration permettant d'inverser les effets de la chaleur n'a été développée. Le premier objectif de notre étude est d'évaluer les effets d'une exposition à une chaleur sèche par une caractérisation systématique d'échantillons avant et après exposition à la chaleur. Des échantillons modèles, issus d'une même peau de veau de tannage végétal connu, ont été utilisés et caractérisés à différentes échelles structurales par un large ensemble de techniques physico-chimiques et biochimiques avant et après chauffage.

Au-delà du brunissement et de la rétraction visible du cuir, la chaleur induit de nombreuses altérations au niveau de la structure du matériau, notamment, une perte de masse, une fonte des structures cristallines, une augmentation de l'hydrophobie ainsi qu'une rigidification. Une partie de ces changements sont attribués à l'agrégation protéique mise en évidence par cette recherche.

Le second objectif était de développer une méthode de restauration innovante basée sur l'utilisation de molécules biologiques afin de respecter la nature de l'objet. Des enzymes de type protéase, capables de rompre les agrégats protéiques ont été utilisées. Un des défis est d'apporter suffisamment d'eau, nécessaire pour l'activité de l'enzyme, sans mouiller le cuir pour éviter tout dommage supplémentaire. Plusieurs supports d'application de la protéase ont été testés. Avec une émulsion enzymatique les résultats obtenus ne mettent en évidence ni coloration, ni rétraction et dans certains cas un gain de souplesse est observé. Des résultats encourageants ont également été obtenus dans le cas d'un cuir de veau historique (XIXe siècle). Des mesures complémentaires ont permis d'attribuer ces propriétés principalement à l'émulsion elle-même, cependant des mesures à plus long terme semblent mettre en évidence un effet positif de l'enzyme sur le gain de souplesse. Sous réserve de nouvelles caractérisations à des temps plus longs, le traitement élaboré pourrait constituer un nouveau support de restauration par voie biologique.

**Mots clefs :** cuir - dénaturation thermique – agrégation protéique – bio-restauration – protéases

# Abstract

---

Heat, induced by fire, is particularly devastating for cultural heritage objects as it causes the destruction of all or part of these witnesses of the past. In this study, we focused on leather, a material largely present in heritage collections. Until now, no restoration method has been developed to treat the damaging effects of heat.

The first aim of our study was to evaluate the effects of dry heat on leather samples through a systematic characterization. Model samples from a calf skin vegetable tanned in known conditions were used and the consequences of heat exposure was characterized at different structural scales using a range of physical, chemical and biochemical methods.

Besides the visible browning and shrinkage of leather, heat induces many changes including a loss of mass, the melt of the crystalline regions, an increase in both hydrophobicity and rigidity. Some of these changes result from the protein aggregation induced by exposure to heat and evidenced by our research.

Our second goal was to develop an innovative restoration method based on the use of biological molecules in order to respect the nature of the object. Enzymes such as proteases, able to hydrolyze protein aggregates, were used. One of the challenges was to provide the water necessary for the enzyme activity without wetting the leather surface in order to avoid further damage of the leather. Several enzyme supports were tested. The use of an enzymatic emulsion reveals neither darkening nor retraction and in some cases a flexibility gain is observed. Encouraging results were also obtained in the case of an ancient book cover made from calfskin and dated from the nineteenth century. Additional measurements lead to attribute its effect mainly to the emulsion itself, however longer-term measurements appear to show a positive effect of the enzyme on the flexibility gain. Although further characterizations on the long term are required, the treatment may constitute a new support for leather bio-restoration.

**Keywords:** leather – thermal denaturation – protein aggregation – bio-restoration - proteases

# Sommaire

---

Remerciements

Résumé

Abstract

Sommaire

Liste des abréviations

Table des figures et tableaux

Liste des communications et collaborations

Introduction générale.....	23
Revue bibliographique .....	27
PARTIE 1 : FABRICATION D'UN CUIR : LA PEAU ET SA TRANSFORMATION.....	28
A. La peau : une structure composée majoritairement de protéines collagéniques .....	28
I.    LA PEAU, UNE STRUCTURE COMPLEXE .....	28
II.   CONSTITUANTS DU DERME .....	30
II.1. LE COLLAGENE .....	30
II.2. L'ELASTINE .....	35
II.3. LA FIBRONECTINE .....	37
II.4. L'ACIDE HYALURONIQUE ET LES GAGS.....	38
B.    De la peau au cuir : les techniques de transformation et l'acquisition de nouvelles propriétés .....	39
I.    LES ETAPES DE FABRICATION .....	39
I.1. LE SECHAGE DES PEAUX .....	39
I.2. LA TREMPE.....	40
I.3. PELANAGE, EBOURRAGE, ECHARNAGE .....	40
I.4. LE DECHAULAGE .....	43
I.5. LE TANNAGE .....	44
I.6. LA TEINTURE .....	44
I.7. LA LUBRIFICATION .....	45
I.8. LE SECHAGE .....	45
II.   LES REACTIONS AU COURS DU TANNAGE .....	46
II.1. LES TANNINS VEGETAUX .....	46
II.2. MECANISMES DE LIAISON DES TANNINS AUX MOLECULES DE COLLAGENE .....	49
C.    Les propriétés d'un cuir suite à sa transformation .....	52

I.	RESISTANCE MECANIQUE.....	52
II.	RESISTANCE A LA CHALEUR.....	54
PARTIE 2 : ALTERATIONS, CARACTERISATION DU DEGRE DE DETERIORATION .....		59
A.	L'altération des cuirs .....	59
I.	LES FACTEURS D'ALTERATION .....	59
II.	LES MECANISMES D'ALTERATION. ....	61
II.1.	MECANISME DE L'HYDROLYSE ACIDE.....	61
II.2.	OXYDATION DE LA MOLECULE DE COLLAGENE.....	61
II.3.	GÉLATINISATION.....	62
B.	Méthodes de caractérisation du degré d'altération des cuirs .....	64
I.	OBSERVATIONS VISUELLES.....	64
II.	ANALYSES THERMIQUES.....	65
II.1.	DETERMINATION DE LA TEMPERATURE DE DENATURATION – STABILITE HYDROTHERMIQUE .....	65
II.2.	DETERMINATION DES TEMPERATURES DE TRANSITION DE PHASE ET IMPACT SUR LES ZONES CRISTALLINES.....	66
III.	ANALYSES CHIMIQUES : FTIR, PH, HPLC.....	67
III.1.	IMPACT DU VIEILLISSEMENT SUR L'ACIDIFICATION DES CUIRS .....	67
III.2.	DETERMINATION DU RATIO ACIDE AMINES ACIDES/BASIQUES .....	67
III.3.	DETERMINATION DES FACTEURS DE DETERIORATION .....	68
IV.	TESTS MECANIQUES .....	69
IV.1.	MODE EN TENSION .....	69
IV.2.	BALAYAGE DE TEMPERATURE .....	70
PARTIE 3 : LES EFFETS DE LA CHALEUR SUR LES CUIRS .....		73
I.	MODIFICATION DES PROPRIETES : VISUELLES, MECANIQUES .....	74
II.	IMPACT AU NIVEAU CHIMIQUE, BIOCHIMIQUE.....	75
II.1.	AGREGATION PROTEIQUE .....	75
II.2.	DESHYDRATATION DES MOLECULES DE COLLAGENE.....	77
II.3.	CHALEUR SECHE : PHENOMENE DE THERMO-OXYDATION .....	78
II.4.	CHALEUR HUMIDE : PHENOMENE D'HYDROLYSE ET DENATURATION HYDROTHERMIQUE .	78
III.	APPROCHES ACTUELLES DE CONSERVATION / RESTAURATION .....	80
III.1.	NETTOYAGE AU SAVON BRECKNELL.....	80
III.2.	LA LUBRIFICATION .....	81
Objectifs des travaux.....		84
Section expérimentale.....		86
PARTIE 1 : MATERIEL .....		87

A.	Les cuirs .....	87
I.	CUIR DE BOVIN, TANNAGE VEGETAL AU MIMOSA .....	87
II.	CUIR DE VEAU, TANNAGE VEGETAL AU SUMAC OU AU MIMOSA .....	87
III.	CUIR DE VEAU, TANNAGE VEGETAL DE TYPE INCONNU .....	87
IV.	CUIR DE VEAU HISTORIQUE, TANNAGE VEGETAL DE TYPE INCONNU .....	88
V.	PARCHEMIN .....	88
B.	Les enzymes.....	88
I.	L'ESPERASE .....	88
II.	LA COLLAGENASE .....	88
III.	LA PEPSINE.....	89
IV.	LA TRYPSINE.....	89
V.	LA THERMOLYSINE .....	89
VI.	LA TRANSGLUTAMINASE .....	89
C.	Les matrices modèles et tannins .....	90
D.	Les supports de traitements de restauration.....	90
	PARTIE 2 : METHODE D'EXPOSITION A UNE CHALEUR SECHE .....	91
	PARTIE 3 : METHODES DE CARACTERISATION .....	91
I.	MESURES COLORIMETRIQUES.....	91
II.	VARIATIONS MASSIQUES ET DIMENSIONNELLES.....	93
III.	MICROSCOPIE OPTIQUE .....	93
IV.	OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB).....	93
V.	MOUILLABILITE ET ANGLE DE CONTACT .....	95
VI.	GONFLEMENT DANS L'EAU - CAPACITE D'HYDRATATION .....	96
VII.	SPECTROSCOPIE INFRA ROUGE .....	96
VIII.	MESURE DU PH DE L'EXTRAIT AQUEUX D'UN CUIR. ....	97
IX.	TABLE CHAUFFANTE .....	97
X.	ANALYSE THERMO-GRAVIMETRIQUE (TGA).....	98
XI.	CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE (DSC) : DETERMINATION DES TEMPERATURES DE TRANSITION DE PHASES .....	99
XII.	ANALYSE THERMO-DIFFERENTIELLE (ATD).....	100
XIII.	EXTRACTION PROTEIQUE - SOLUBILISATION SEQUENTIELLE .....	100
XIV.	DOSAGE DES PEPTIDES ET PROTEINES PAR LA METHODE DE FIELDS .....	102
XV.	WESTERN BLOT.....	103
XVI.	RHEOLOGIE .....	104
XVII.	ANALYSE MECANIQUE DYNAMIQUE (DMA) : BALAYAGE DE FREQUENCE ET DE TEMPS. ..	105
XVIII.	TESTS STATISTIQUES.....	106

PARTIE 3 : STRATEGIE DE RESTAURATION PAR VOIE ENZYMATIQUE .....	107
A. supports de restauration enzymatique.....	107
I. SOLUTION ENZYMATIQUE.....	107
II. GEL POLYSACCHARIDIQUE ENZYMATIQUE .....	107
III. ESSAI DE RESTAURATION DES CUIRS PAR APPLICATION D'UN GEL PROTEIQUE ENZYMATIQUE.....	108
IV. ESSAI DE RESTAURATION DES CUIRS PAR APPLICATION D'UNE SOLUTION AQUEUSE CONTENANT UN CO-SOLVANT : LE GLYCEROL .....	109
V. ESSAI DE RESTAURATION DES CUIRS PAR APPLICATION D'UNE EMULSION ENZYMATIQUE..	109
B. Test d'activité protéolytique des enzymes.....	110
I. MATRICES MODELES .....	110
I.1. MATRICE MODELE GELATINE - GLUTARALDEHYDE.....	110
I.2. MATRICE MODELE GELATINE – TANNINS.....	110
II. TEST D'INACTIVITE DE L'ENZYME AU CONTACT DES TANNINS .....	110
III. TEST D'ACTIVITE SUR UN PARCHEMIN.....	111
Résultats et discussions.....	112
Préambule : choix des conditions d'exposition à la chaleur .....	114
PARTIE 1 : CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES DES CHANGEMENTS ENGENDRES SUR LES CUIRS PAR L'EXPOSITION A LA CHALEUR.....	117
A. Variations globales d'aspect, de morphologie et relation à l'eau .....	117
I. VARIATIONS COLORIMETRIQUES .....	117
II. VARIATIONS MASSIQUES ET DIMENSIONNELLES .....	119
III. VARIATIONS MORPHOLOGIQUES.....	120
IV. IMPACT DE L'EXPOSITION A LA CHALEUR SUR LES PROPRIETES DE SURFACE ET DE MOUILLAGE .....	122
V. IMPACT DE LA CHALEUR SUR LES CAPACITES D'ABSORPTION D'EAU.....	126
B. effet de la chaleur au niveau moléculaire et protéique.....	129
I. IDENTIFICATION DES MECANISMES D'ALTERATION DES CUIRS.....	129
II. STABILITE HYDROTHERMIQUE DES CUIRS.....	132
III. DEVENIR DES CONSTITUANTS DU CUIR.....	133
IV. EFFET DE LA CHALEUR SUR LES CONSTITUANTS PROTEIQUES .....	141
IV.1.REPARTITION DES PROTEINES EXTRAITES.....	141
IV.2.IMMUNO-DETECTION DE PROTEINES D'INTERET. ....	143
C. Conséquences de l'exposition à la chaleur sur les propriétés mécaniques.....	145
I. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION A LA CHALEUR SUR LA FLEXIBILITE DU CUIR. ....	147
II. CINETIQUE D'EVOLUTION DES PROPRIETES AU COURS DE L'EXPOSITION A LA CHALEUR .....	149
PARTIE 2 : STRATEGIE DE RESTAURATION PAR VOIE ENZYMATIQUE .....	156

A.	Développement d'un support pour l'application d'un traitement de restauration enzymatique....	156
I.	SOLUTION ENZYMATIQUE .....	157
II.	GELS ENZYMATIQUES .....	158
II.1.	GELS POLYSACCHARIDIQUES ENZYMATIQUE .....	159
II.2.	GELS PROTEIQUES ENZYMATIQUES : GELS DE GELATINE CONTENANT UNE PROTEASE .....	163
III.	SOLUTION AQUEUSE CONTENANT UN CO-SOLVANT DEPRESSEUR D'ACTIVITE THERMODYNAMIQUE DE L'EAU.....	167
IV.	EMULSION ENZYMATIQUE .....	171
B.	Caractérisation des effets du traitement émulsion enzymatique.....	173
I.	CARACTERISATION DES EFFETS DE L'EMULSION SUR L'ASPECT DES ECHANTILLONS.....	173
I.1.	VARIATIONS DE COULEUR .....	173
I.2.	MORPHOLOGIE DE SURFACE .....	174
I.3	PROPRIETES DE SURFACE ET CAPACITES D'ABSORPTION D'EAU .....	176
II.	PROPRIETES MECANIQUES.....	178
II.1.	EFFET DU TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUR LA FLEXIBILITE DU CUIR .....	178
C.	Analyse des capacités protéolytiques de l'enzyme sur des matrices modèles.....	185
D.	Caractérisation des effets du traitement émulsion enzymatique sur un cuir historique de veau....	189
E.	Effet du traitement à long terme sur les cuirs chauffés.....	191
	Conclusion générale .....	194
	Références bibliographiques .....	198
	Annexes .....	206



# Liste des abréviations

AH	Acide hyaluronique
ATD	Analyse thermo-différentielle
ATR	Réflectance totale atténuée (Attenuated Total Reflectance)
$a_w$	Activité thermodynamique de l'eau
Bnf	Bibliothèque nationale de France François Mitterand
$Ca^{2+}$	Ion calcium
$Ca(OH)_2$	Chaux
CM	Cuir de tannage au mimosa
CM STEP	Cuir de tannage au mimosa issu du projet STEP
CS	Cuir de tannage au sumac issu du projet STEP
Da	Dalton : g/mol
DMA	Analyse mécanique dynamique (dynamic mechanical analysis)
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry)
$E'$	Module de conservation (DMA)
$G'$	Module de stockage (rhéologie)
$G''$	Module de perte (rhéologie)
GAGs	Glycosaminoglycanes
Gly	Glycine
$H_2SO_4$	Acide sulfurique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
$K^+$	Ion potassium
Ke	Taux d'évaporation
Kd	Taux de diffusion
KOH	Hydroxyde de potassium
HPLC	Chromatographie phase liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatographie)
HR	Humidité relative
Liaison H	Liaison hydrogène
M	Molaire
nm	Nanomètre
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MHT	Table chauffante (Micro Hot Table)
MMP	Metallo protéases de la matrice (Matrix metallo protease)
MO	Microscopie Optique
$Na^+$	Ion sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium - soude
OCT	Optical Coherence Tomography
Pa	Pascal
pH	Potentiel Hydrogène
PM	Poids moléculaire
Pro	Proline
s	Seconde
$SO_2$	Dioxyde de soufre
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Gel d'électrophorèse en polyacrylamide contenant du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)
$\tan \delta$	Facteur de perte (DMA)
$T_g$	Température de transition vitreuse
TGA	Analyse thermogravimétrique (ThermoGravimetric Analysis)
$TG^{ase}$	Transglutaminase

T <sub>m</sub>	Température de fusion (melting temperature)
TNBS	Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique
T-TBS	Tampon salin TRIS (Tween-Tris Buffered Saline)
WB	Western Blot
βSH	β-mercaptoéthanol
ΔE	Différence de couleur
Δν	Ecart entre bande amide I et II
θE	Angle de contact

# Table des figures et tableaux

---

## Liste des figures

Figure 1 : Logo de la fondation des sciences du patrimoine - Patrima.....	24
Figure 2: Architecture de la peau. La peau se compose de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Ménillet et Mordenti 2015). .....	29
Figure 3 : structure des principaux acides aminés constitutifs de la molécule de collagène .....	30
Figure 4 : [A] Représentation des liaisons hydrogène intermoléculaires au niveau des régions riches en Glycine (Gly) de la triple hélice de collagène. [B] Schéma de la liaison hydrogène (H) au niveau d'acides aminés (Voet et Voet 2005; Kite et Thomson 2006). [A] La chaîne 1 est répétée afin de réaliser une projection cylindrique. Les 3 chaînes sont décalées verticalement d'un résidu afin que les différents acides aminés Gly-X et Y des trois chaînes se retrouvent au même niveau. Les boules blanches symbolisent les groupements H, les boules rouges OH. La glycine (Gly) est représentée par une chaîne latérale circulaire blanche, la proline par un cycle et l'hydroxyproline par un cycle accompagné d'un groupement rouge. ....	31
Figure 5 : Modèle illustrant les liaisons hydrogènes intervenant entre les molécules de collagène et celles d'eau, permettant la stabilisation des molécules entre elles (Covington et Covington 2009). ...	32
Figure 6 : [A] Observation de fibres de collagène au microscope électronique à transmission. [B] Schéma représentant l'arrangement des molécules en fibrilles.[C] Liaisons intermoléculaire au niveau des triples hélice de collagène et représentation de la période D intermoléculaire du collagène d'une longueur de 67nm. [A] et [B] Tirés de (Richard, Chevalet, et Soubaya 2014), [C] D'après (Yamauchi et Sricholpech 2012). ....	33
Figure 7 : Mécanisme d'action de la lysyl oxydase aboutissant à la formation d'une liaison covalente entre deux résidus lysine de la chaîne de collagène (Voet et Voet 2005). ....	34
Figure 8 : Représentation schématique d'une desmosine et d'une iso-desmosine. D'après (Covington et Covington 2009). ....	36
Figure 9 : Structure d'une des sous unités de la fibronectine, et séquences d'interaction de la fibronectine à différentes molécules. D'après (Hubmacher et al. 2011). ....	37
Figure 10 : Rupture des liaisons hydrogène par ajout d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) lors du processus de chaulage (Covington et Covington 2009). ....	41
Figure 11 : Mécanisme d'hydrolyse des chaînes latérales amides lors du chaulage aboutissant à la transformation de l'asparagine et de la glutamine en acide aspartique et acide glutamique respectivement, accompagnée d'une libération d'ammoniac (Covington et Covington 2009). ....	42
Figure 12 : Transformation des triglycérides en glycérol et savon au cours du chaulage (Covington et Covington 2009). ....	42
Figure 13 : Structure chimique des tannins hydrolysables de type gallotannins (Mueller-Harvey 2001). ....	47
Figure 14 : Structure d'un type de tannins hydrolysables : les gallotannins(Covington 1997).....	48
Figure 15 : Exemple de structure chimique de tannins condensés (Richardin et al. 1988). ....	48
Figure 16 : Hypothèse du mécanisme de polymérisation des tannins condensés (Richardin et al. 1988). ....	49
Figure 17 : Formation de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyle des polyphénols et la molécule de collagène (Covington et Covington 2009). ....	50

Figure 18 : Schéma réactionnel entre une quinone du tannin et une molécule de collagène(Covington 1997).....	50
Figure 19 : Schéma illustrant l'impact de l'épaisseur de la peau et du ratio fleur/derme sur les propriétés mécaniques du matériau (Covington et Covington 2009). ....	52
Figure 20 : Relation entre la disposition des fibres et la résistance à la déchirure du matériau (Chahine 2013).....	53
Figure 21 : Illustration de l'anisotropie de la peau (Covington et Covington 2009). ....	53
Figure 22 : Représentation de la position officielle d'échantillonnage sur le cuir (Covington et Covington 2009). ....	54
Figure 23 : Profil de DSC obtenus dans le cas de différents types de tannage représentatifs d'une population de molécules possédant des propriétés thermiques identiques (gauche) ou de plusieurs populations (droite). A droite cela met en évidence un tannage non homogène (figures dans (Tang, Covington, et Hancock 2003).....	56
Figure 24 : Structure du collagène. [A] Structure en triple hélice du (tropo)collagène. [B] Schéma de l'interaction entre groupements d'acides aminés de chaines voisines via des liaisons hydrogène. [C] Schéma des liaisons hydrogène entre chaîne $\alpha$ , via l'intermédiaire des molécules d'eau. [D] Schéma du regroupement des triples hélices en fibrilles. ....	57
Figure 25 :Schéma bilan de l'impact du processus de transformation d'une peau en cuir au niveau de la molécule de collagène. Le schéma proposé représente les deux types de stabilisation hydrogène et covalentes des molécules de collagène par les tannins, possible dans le cas de l'utilisation de tannins de type condensés. ....	58
Figure 26 : Effet des variations d'humidité relative sur les molécules non tannantes (Thomson 2006b). ....	60
Figure 27 : Mécanisme d'hydrolyse acide. ....	61
Figure 28 : Mécanisme de clivage de la chaîne polypeptidique par oxydation (Kennedy et Wess 2003b; Bowes et Raistrick 1967). ....	62
Figure 29: Corrélation entre taux d'hydratation de l'élastine et la température de transition vitreuse. ....	63
Figure 30 : Cuirs historiques à différents degrés de détérioration. [A] cuir de veau/bovin extrêmement détérioré. Les pores ne sont quasiment plus discernables. [B]cuir de mouton présentant des déchirures et craquelures (Bernath, Miu, et Guttmann 2008).....	64
Figure 31 : Observations au MEB d'un cuir de chèvre de tannage végétal récent d'après Haines 1981 et l'observation au MEB d'un cuir historique du 19eme siècle (Abdel-Maksoud 2011).....	64
Figure 32 : Moyenne des valeurs de températures de dénaturation ( $T_d$ ) obtenues dans le cas de cuirs neufs et anciens(XVe-XIXe siècles) de tannage végétal (Budrugaec et Miu 2008).....	65
Figure 33 : Analyse en DSC de (A) cuir neuf de tannage végétal, (B-D) cuirs historiques de tannage végétal du 18 <sup>e</sup> siècle (Budrugaec et Miu 2008). Histogramme : comparaison des températures de dégradation ( $T_{deg}$ ) entre cuirs de tannage végétal neufs et historiques. ....	66
Figure 34 : Détermination du taux d'acides aminés par HPLC , après hydrolyse, de cuirs neufs et d'un cuir ancien (XV-XVIe siècles) (V. Plavan et al. 2013).....	68
Figure 35 : Profil infrarouge ATR obtenu dans le cas d'un parchemin de manuscrit byzantin (IX-Xe siècle) [A] (Carşote et al. 2014) ou d'un cuir de veau tanné au quebracho (tannins condensés) [B](Plavan et al. 2010). Les signaux sont globalement similaires. ....	69
Figure 36 : Courbes représentant les valeurs de $\tan\delta(a)$ et valeurs de module de conservation $E'(b)$ dans le cas de cuirs de chèvre de tannage au sumac neuf ou vieilli artificiellement (équivalent 10 ans) (Odlyha et al. 2000). ....	70
Figure 37 : Profil de DMA obtenu par balayage de température sur un échantillon neuf et un échantillon historique (Cucos et Budrugaec 2010).....	70

Figure 38 : Changements de couleur des échantillons de cuirs de tannage mimosa, sumac ou non tannés après plusieurs cycles d'exposition à la chaleur pendant 1 jour à 120°C, suivi de 6 jours d'exposition dans une atmosphère polluée à 40°C (Larsen, Vest, et Calnan 1994). ....	74
Figure 39 : Effet de la température et de l'atmosphère sur le pourcentage de perte de résistance à la traction de cuirs (Kanagy 1940). ....	75
Figure 40 : Observation des molécules de collagène présentes dans la peau de souris après brulures dans l'eau pendant 10 secondes à différentes températures (70,78 ou 98°C) (Tanaka et al. 2013).....	76
Figure 41 : Conséquences de la déshydratation des molécules de collagène sur les variations de période D intermoléculaires. ....	77
Figure 42 : Représentation schématique de la rupture par hydrolyse de molécules de collagène non tannées ou tannées en condition de chaleur humide. La présence de tannin stabilise les molécules de collagène et retarde sa désorganisation. (Bowes et Cater 1965). ....	79
Figure 43 : Effets de l'application de lubrifiants (cire 212 ou cire 213) sur des cuirs soumis à une pollution artificielle pendant 30 semaines (cuir n°18) ou conservé 10 ans sur site pollué (cuir n°9) (Chahine 2013). ....	81
Figure 44 : Représentation des axes colorimétriques (Gonnet 1998).....	92
Figure 45 : Illustration de la poire de diffusion. ....	93
Figure 46: Représentation schématique des particules réémises en réponse du faisceau d'électrons incident. ....	94
Figure 47 : Représentation des 3 tensions de surface s'exerçant à l'interface goutte / support. ....	95
Figure 48 : Détermination du caractère hydrophile / hydrophobe par mesure de l'angle de contact. .	95
Figure 49 : Schéma illustrant les différentes étapes de contraction des fibres lors de l'analyse par table chauffante. ....	98
Figure 50 : Thermogramme illustrant les différentes transitions de phase observables au cours de la chauffe d'un matériau. ....	99
Figure 51 : Illustration du protocole d'extraction protéique séquentielle. ....	102
Figure 52 : Représentation schématique de la variation de la vitesse d'écoulement en fonction des différentes couches d'un matériau. ....	104
Figure 53 : Gel de gélatine obtenu à (A) $T < 30^{\circ}\text{C}$ en absence de transglutaminase : liaisons hydrogène = gel physique, (B) $T > 30^{\circ}\text{C}$ en présence de transglutaminase : liaisons covalentes = gel chimique , (C) $T > 30^{\circ}\text{C}$ en présence de transglutaminase, puis placé à $T < 30^{\circ}\text{C}$ : liaisons covalentes + triple hélices = gel chimique –physique. ....	108
Figure 54 : Echantillons exposés à une chaleur sèche à différentes températures et pourcentage de perte de masse. ....	114
Figure 55 : Apparence de la surface fleur d'échantillons de cuir brut ou exposé à la chaleur 4 jours à 150, 160 ou 170°C. La couleur des échantillons n'est pas normalisée. ....	116
Figure 56 : Pourcentage de perte de masse [A] et de variation dimensionnelle [B] des cuirs suite à l'exposition à la chaleur. ....	119
Figure 57 : Observations en microscopie optique (MO) en champs sombre (lumière rasante) et électronique à balayage (MEB) de la surface fleur des cuirs et des fibres. ....	121
Figure 58 : Etude de l'interaction entre une goutte d'eau de 15µL et la surface (face fleur) du cuir. .	123
Figure 59 : Mesures d'angles de contact dynamique réalisé entre 0° (support horizontal) et 90° (support vertical) dans le cas des cuirs chauffés. ....	126
Figure 60 : Capacités d'absorption d'eau des échantillons de cuirs bruts et chauffés dans différentes conditions. ....	127
Figure 61 : Spectres infrarouge ATR réalisés entre 4000 et 600cm <sup>-1</sup> . De haut en bas (brut, chauffé 4 jours 100°C, chauffé 25 heures 160°C, chauffé 4 jours 160°C). ....	129

Figure 62 : Détermination de la température de dénaturation hydrothermique par observation par la méthode de la table chauffante de l'état de contraction de fibres de cuir (CM brut) immergées dans de l'eau au cours de l'augmentation de température.....	132
Figure 63 : [A]-[D] : Thermogrammes obtenus par analyse TGA entre 25 et 800°C dans le cas des cuirs brut [A], chauffé 4 jours à 100°C [B], 25 heures à 160°C [C] et 4 jours à 160°C [D]. Le signal vert (trait plein) représente le pourcentage de perte de masse au cours de l'augmentation de température. Le signal bleu (pointillé) représente la dérivée première du signal. Deux phénomènes distincts de perte de masse sont observés lors de l'analyse. Les pourcentages de perte de masse de chacun des phénomènes ainsi que le pourcentage total de perte de masse sont indiqués sous chacune des figures. [E] : Thermogramme obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) entre 25 et 280°C dans le cas du cuir brut (trait plein) et du cuir chauffé 4 jours à 160°C (trait pointillé). [F] : Thermogrammes obtenus par analyse ATD entre 25 et 400°C dans le cas du cuir brut (signal vert) et chauffé 4 jours à 160°C (signal rouge). Les signaux en pointillé représentent le signal ATD, ceux en trait plein la dérivée seconde indiquant les phénomènes endothermiques ou exothermiques. ....	134
Figure 64 : Thermogrammes de calorimétrie différentielle à balayage obtenus dans le cas des cuirs de tannage au sumac brut et chauffé 4 jours à 160°C. ....	137
Figure 65 : Thermogrammes obtenus dans le cas d'un cuir brut de tannage au sumac CS-A brut (gauche) et chauffé 4 jours à 160°C CS-A 4 jours 160°C (droite). ....	138
Figure 66 : Thermogramme obtenu par analyse ATD dans le cas du cuir de tannage mimosa brut (CM brut - profil rose) et du cuir de tannage au sumac (CS-A brut – profil bleu). L'analyse est réalisée entre 25 et 400°C à une vitesse de chauffe de 10°C/min. Les profils en pointillés représentent le profil ATD, ceux en trait plein représentent la dérivée seconde du profil ATD. ....	140
Figure 67 : Répartition des protéines dosées (%) au sein des différentes fractions. Les fractions ont été obtenues par immersion de pièce de cuir dans des solutions de plus en plus dénaturantes ( 1 : eau ; 2 : 10%NaCl ; 3 : 70% éthanol ; 4 : 8M urée +2% $\beta$ mercaptoéthanol ; 5 : 0,1% hydroxyde de potassium). ....	141
Figure 68 : Répartition des protéines dosées (%) au sein des différentes fractions après centrifugation sur Centricon <sup>®</sup> (seuil de coupure 10 kDa). Les fractions ont été obtenues par immersion de pièce de cuir dans des solutions de plus en plus dénaturantes ( 1 : eau ; 2 : 10%NaCl ; 3 : 70% éthanol ; 4 : 8M urée +2% $\beta$ mercaptoéthanol ; 5 : 0,1%hydroxyde de potassium). ....	142
Figure 69 : Immuno-détection de la présence de fibronectine au sein des différentes fractions d'extraction protéique par la technique du Western Blot. Les différentes fractions sont les suivantes : 1 : eau ; 2 : 10% NaCl ; 3 : 70% éthanol ; 4 : 8M urée + 2% $\beta$ -mercaptoéthanol ; 5 : 0,1% d'hydroxyde de potassium. Le témoin utilisé (T) est de la fibronectine. L'observation d'un signal traduit la présence de fibronectine.....	143
Figure 70 : Détermination de la plage de fréquence stable dans le cas d'un échantillon de cuir mimosa brut (CM brut).....	145
Figure 71 : Variations de signal observées en fonction de l'état de l'échantillon et au cours de la cinétique de mesures des valeurs de module de conservation $E'$ réalisée à une fréquence de 1Hz sur une durée de 15 minutes. Les mesures ont été effectuées sur plusieurs échantillons. Les résultats sont présentés dans le cas des échantillons de cuir mimosa A [A] et B[B] dans différents états (CM brut, CM 4 jours 160°C, CM 4 jours 160°C – émulsion avec ou sans enzyme). ....	146
Figure 72 : Nombre d'éprouvettes de cuir brut (CM brut) [A] ou chauffé 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C) [B]correspondant aux différents intervalles de valeurs de module de conservation $E'$ (MPa). 147	
Figure 73 : Mesure des propriétés mécaniques de cuirs bruts et exposés à la chaleur pendant 4 jours à 100°C, 25 heures à 160°C et 4 jours à 160°C. Les valeurs sont normées par rapport au cuir brut (cuir brut=1) [A] : Mesure des modules de conservation $G'$ et de perte $G''$ par rhéologie, [B] : Mesure des	

modules de conservation $E'$ par DMA. Les tests statistiques sont calculés par rapport aux valeurs des échantillons bruts avec $p < 0,05$ : * ; $p < 0,01$ : ** ; $p < 0,001$ : ***. ....	148
Figure 74 : Mesure des modules de conservation $E'$ par DMA sur les cuirs de tannage au sumac bruts et après exposition à 160°C durant 4 Jours. Les valeurs sont normées par rapport au cuir brut (cuir brut=1). ....	149
Figure 75 : Cinétiques d'évolution d'un échantillon de cuir soumis à un chauffage à 160 °C pendant 4 jours [A] Mesures du module de conservation $E'$ et de la longueur par DMA. [B] Mesure des propriétés énergétiques par ATD. [C] Mesure de la masse par TGA. ....	150
Figure 76 : [A]-[D] Etat d'un cuir brut à différentes échelles structurales. [A] Observations macroscopiques d'un cuir brut (couleur et dimensions). [B] Propriétés de surface d'un cuir brut déterminées par mesure d'angles de contact et mouillabilité. [C] Schéma de l'état de molécules de collagène au sein d'un cuir brut. [D] Schéma de la formation de liaisons hydrogènes au sein de la triple hélice grâce aux molécules d'eau. ....	153
Figure 77 : [A]-[C] Etat d'un cuir exposé à une chaleur sèche à différentes échelles structurales. [A] Observations macroscopiques d'un cuir après exposition à la chaleur (couleur et dimensions). [B] Propriétés de surface d'un cuir exposé à la chaleur déterminées par mesure d'angles de contact et mouillabilité. [C] Schéma de l'état de molécules de collagène au sein d'un cuir chauffé et impacts à l'échelle moléculaire. ....	154
Figure 78 : Illustration de l'hypothèse des effets de la chaleur et stratégie de restauration utilisant une protéase dans le but de rompre les agrégats protéique néoformés lors de l'exposition à la chaleur. ....	155
Figure 79 : Effet de l'incubation de cuirs de tannage au mimosa bruts et exposés à la chaleur dans différents milieux réactionnels additionnés de collagénase (eau ou HEPES +/- chlorure de calcium) pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect (dimension, coloration). ....	157
Figure 80 : Effet de l'incubation de cuirs bruts mimosa STEP (CM STEP) et exposés à la chaleur au contact de gels polysaccharidiques aqueux renfermant de la thermolysine (eau +/- chlorure de calcium) pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect (dimension, coloration). ....	159
Figure 81 : Effet de l'incubation de cuirs bruts mimosa STEP (CM STEP) et exposés à la chaleur au contact de gels polysaccharidiques préparés à base d'HEPES et renfermant de la thermolysine (HEPES +/- chlorure de calcium) pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect (dimension, coloration). ....	160
Figure 82 : Effet de l'incubation de cuirs sumac bruts au contact de gels d'agar enzymatiques préparés à partir d'eau +/- chlorure de calcium pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect la morphologie et les propriétés de surface. ....	161
Figure 83 : Effet de l'incubation de cuirs sumac chauffés 4 jours à 160°C au contact de gels d'agar enzymatiques préparés à partir d'eau +/- chlorure de calcium pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect la morphologie est les propriétés de surface. ....	162
Figure 84 : Effet de l'application de gels de gélatine seuls ou additionnés de protéase (collagénase ou Espérase®) sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à température ambiante sur leur aspect général ainsi que sur la morphologie et les propriétés de surface. ....	164
Figure 85 : Effet de l'application de gels de gélatine + transglutaminase additionnés ou non de protéase (collagénase ou Espérase®) sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C sur leur aspect général ainsi que sur la morphologie et les propriétés de surface. ....	165
Figure 86 : Effet de l'application de gels de gélatine + transglutaminase additionnés ou non de protéase (collagénase ou Espérase®) sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à température ambiante sur leur aspect général ainsi que sur la morphologie et les propriétés de surface. ....	166
Figure 87 : Effet de l'application d'une solution enzymatique contenant différentes concentrations de glycérol sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C sur leur aspect général. ....	167

Figure 88 : Observation de la coloration des solutions enzymatiques contenant différentes concentrations de glycérol sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C.....	168
Figure 89 : effet de l'application d'une solution enzymatique contenant différentes concentrations de co-solvant sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C sur les capacités d'absorption d'eau des échantillons. ....	169
Figure 90 : Comparaison de la stabilité « hydrothermique » de fibres de cuirs chauffés CM STEP 4 jours 160°C par la technique de la MHT en excès d'eau ou de glycérol pur.....	170
Figure 91 : Effet de l'application d'une émulsion enzymatique sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à température ambiante sur l'aspect des échantillons.....	172
Figure 92 : Observations en microscopie optique en champ sombre ((MO, lumière rasante) et microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface fleur des cuirs brut (CM brut) et chauffés (CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C et CM 4 jours 160°C). Le traitement émulsion additionné ou non d'enzyme a été appliqué en surface, les cuirs non traités font office de témoins.....	175
Figure 93 : Angles de contact observés dans le cas d'échantillons bruts et chauffés 4 jours à 160°C après application du traitement émulsion enzymatique ou émulsion seule. ....	176
Figure 94 : Pourcentage d'absorption d'eau par rapport à la masse initiale observé dans le cas d'échantillons bruts (CM brut), exposés à la chaleur (CM 4 jours 160°C) puis traités par application de l'émulsion vierge ou enzymatique (CM 4 jours 160°C – émulsion sans enzyme ou – émulsion enzymatique). ....	177
Figure 95 : Effets des traitements (émulsion avec ou sans enzyme) sur les propriétés mécaniques de cuirs mimosa bruts et exposés à la chaleur pendant 4 jours à 100°C, 25 heures à 160°C et 4 jours à 160°C. Les valeurs des cuirs chauffés sont normées par rapport au cuir brut et celles des cuirs traités par rapport aux cuirs chauffés (cuir brut=1). [A-B] mesures de rhéologie. [A] Effets de l'application de l'émulsion avec ou sans enzyme sur les valeurs de module de stockage ( $G'$ ). [B] Effets de l'application de l'émulsion avec ou sans enzyme sur les valeurs de module de perte ( $G''$ ). [C] : Mesures des modules de conservation $E'$ par DMA. Les tests statistiques sont calculés par rapport à l'échantillon normé correspondant avec $p<0,05$ : * ; $p<0,01$ : ** ; $p<0.001$ : ***.....	179
Figure 96 : Valeurs de gain de souplesse observées dans le cas de divers échantillons de cuirs chauffés traité par l'émulsion enzymatique.....	181
Figure 97 : Suivi de l'effet du traitement émulsion enzymatique appliquée sur un cuir chauffé. Les variations de module de conservation $E'$ et de taille sont suivies par DMA depuis le moment de l'application et jusqu'à 3 jours après traitement. ....	182
Figure 98 : Variations des valeurs de module de conservation $E'$ et de taille observées par DMA dans le cas d'un cuir témoin, non traité, au cours de la sollicitation de l'échantillon pendant 3 jours. ....	183
Figure 99 : Effets de l'incubation entre différentes matrices modèles réticulées (glutaraldéhyde, et/ou tannins) et une solution d'Espérase® (150U/mL) pendant 3 jours à température ambiante .....	186
Figure 100 : Effets de l'incubation d'un parchemin dans une solution d'Espérase® (150U/mL) pendant 7 jours à température ambiante. ....	187
Figure 101 : Surface d'un échantillon de cuir de veau historique (XIXe siècle) vue en microscopie optique en champs sombre (x100), avant et après application de l'émulsion avec ou sans enzyme(Espérase®).....	189
Figure 102 : Effets des traitements (émulsion avec ou sans enzyme) sur les propriétés mécaniques de cuirs historiques (cuir de veau prélevé sur un ouvrage daté du XIXe siècle). Les valeurs sont normées (cuir brut=1). Les tests statistiques sont calculés par rapport à l'échantillon normé correspondant avec $p<0,05$ : * ; $p<0,01$ : ** ; $p<0.001$ : ***. ....	190
Figure 103 : Effets des traitements (émulsion avec ou sans enzyme) sur les propriétés mécaniques de cuirs de tannage au mimosa chauffés 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C). Les valeurs sont normées	



(cuir brut=1 et cuir chauffé 4 jours 160°C =4,43). Les tests statistiques sont calculés par rapport à l'échantillon normé correspondant avec  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\*..... 191

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Arrangement des fibrilles de collagène au niveau de différents tissus (peau, tendon, cartilage et cornée). ....	35
Tableau 2 : Comparaison de la teneur en différents acides aminés sur un total de 1000 résidus, entre le collagène et l'élastine. ....	37
Tableau 3 : Comparaison des pourcentages respectifs de tannins et non tannins présents au sein de cuirs de tannage hydrolysable (sumac et myrobolam) et de tannin condensés (mimosa et chêne). ....	47
Tableau 4 : Comparaison des températures de dénaturation entre peaux non tannées (Covington et Covington 2009). ....	55
Tableau 5 : Comparaison des températures de dénaturation entre peaux tannées. (Covington et Covington 2009). ....	55
Tableau 6 : Action des différentes solutions utilisées lors de l'extraction séquentielle des protéines. ....	101
Tableau 7 : Valeurs $L^*a^*b^*$ mesurées sur des cuirs mimosa brut (CM brut) et exposés à la chaleur dans différentes conditions : 4 jours à 100°C (CM 4 jours 100°C) ; 25 heures à 160°C (CM 25 heures 160°C) et 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C). Les valeurs de différences de couleur ( $\Delta E$ ) sont calculées entre l'échantillon de cuir brut et ceux exposés à la chaleur. ....	118
Tableau 8 : Variations de taille et de diamètre des fibres de cuirs prélevées à l'aide d'une pince pour l'observation au MEB dans le cas de cuirs brut (CM brut) ou chauffés (CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C, CM 4 jours 1660°C). ....	122
Tableau 9 : Comparaison des modèles de Wenzel et Cassie (Cassie et Baxter 1944 ; Bhushan, Jung, et Koch 2009 ; Quéré 2015). ....	125
Tableau 10 : Valeurs représentatives des écarts et ratio entre bande amide I et II et étude de la bande/épaulement à $1740\text{cm}^{-1}$ ....	130
Tableau 11 : Photographie et calcul de la différence de couleur $\Delta E$ après application des différents traitements enzymatique et non enzymatique. ....	173
Tableau 12 : valeurs de modules de stockage $G'$ et de perte $G''$ obtenues par rhéologie dans le cas de cuirs bruts et chauffés (CM brut, CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C, CM 4 jours 160°C). ....	178
Tableau 13 : Evolution des valeurs de module de conservation au cours de la mesure en cinétique des effets de l'émulsion enzymatique et comparaison avec les valeurs du cuir témoin (non traité). ....	183

# Liste des communications et collaborations

---

- ACTE DE COLLOQUE

**Characterization of the effect of heat on vegetable tanned leather and restoration trials through enzymatic processes**, Eléonore Izquierdo, Laurianne Robinet, Michel Boissière, Bertrand Lavédrine, Veronique Larreta-Garde.

Publié en version papier dans "ICAMS 2014 ADVANCED MATERIALS AND SYSTEMS", chapter V-Cultural Heritage, p517-522.

Disponible sur internet et sur demande à l'adresse « [icams.ro@gmail.com](mailto:icams.ro@gmail.com) » : ICAMS 2014 Proceedings, publié par CERTEX, ISSN 2068-0783 , p517-522.

- COMMUNICATIONS ORALES

**Caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal et essais de restauration enzymatique**, Eléonore Izquierdo.

Journée de promotion de la fondation des sciences du patrimoine.

Cergy-Pontoise, France, 2 juillet 2015.

**Characterization of the effect of heat on vegetable tanned leather and restoration trials through enzymatic processes**, Eléonore Izquierdo.

5th International Conference on Advanced Materials and Systems – ICAMS.

Bucarest, Roumanie, 23-25 octobre 2014.

**Caractérisation des effets de la chaleur sur l'altération des cuirs et essais de restauration**, Eléonore Izquierdo.

Rencontres thématiques de l'ARSAG (Association pour la Recherche Scientifique sur les Arts Graphiques).

Paris, France, 21 mars 2014.

**Caractérisations physicochimique et biochimique de l'altération de cuirs et essais de restauration par la voie enzymatique**, Eléonore Izquierdo.

Journée de présentation des thèses PATRIMA.

Champs sur Marne, France, 11 février 2014.

- COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

**Characterization of the effect of heat on vegetable tanned leather and restoration trials through enzymatic processes**, Eléonore Izquierdo, Michel Boissière, Laurianne Robinet, Bertrand Lavédrine, Véronique Larreta-Garde.

Journée de l'école doctorale sciences et ingénierie.

Neuville sur Oise, France, 24 juin 2015.

**Characterization of the effect of heat on vegetable tanned leather**, Eléonore Izquierdo, Michel Boissière, Laurianne Robinet, Véronique Larreta-Garde, Bertrand Lavédrine.

Les sciences de la conservation du patrimoine et le développement durable, acquis, recherche, innovation.

Paris, France, 23-25 octobre 2013.

- COLLABORATIONS

*Laboratoire de Physicochimie des Polymères et des Interfaces(LPPI)*, EA 2528, Neuville, France.

Laboratoire de Mécanique et Matériaux du Génie Civil (L2MGC), EA 4114, Neuville, France.

Leather and Footwear Research Institute (ICPI), Bucarest, Roumanie.

# Introduction générale

Dans un contexte lié à la culture et à l'histoire, une partie du patrimoine matériel représente un témoin du passé devant être transmis aux générations futures. Afin d'assurer la pérennité et ainsi la bonne transmission de ces biens, les principes de conservation et de restauration apparaissent comme primordiaux.

Au cours des dernières décennies, de nombreuses politiques de conservation et restauration ont été mises en œuvre. Plusieurs organismes internationaux (ICCROM, ICOM, ICOM-CC, ICOMOS, IFLA) ont proposé des textes relatifs aux principes de conservation et de restauration ce qui a permis de mettre en place des procédures d'interventions internationales aussi bien pour le patrimoine bâti ou mobilier, des fonds d'archives ou encore des collections. Parmi ces différents documents, référencés par le ministère de la culture et de la communication figurent : la Charte de Venise (1965), le document Nara sur l'authenticité (1994), le Code de déontologie de l'ICOM pour les musées (2006) et la terminologie de la conservation-restauration du patrimoine culturel matériel (2008).

Parmi les directives données, les collections doivent être protégées des sinistres cependant bien que des stratégies soient mises en place, des catastrophes peuvent survenir.

Dans le cadre du programme des Investissements d'avenir du Grand Emprunt en 2011, le laboratoire d'excellence, LabEx, Patrima (**Figure 1**) a été créé avec pour ambition de structurer la recherche autour du patrimoine culturel matériel, avec trois axes :

- la connaissance intime du patrimoine
- l'amélioration des procédés de conservation et de restauration
- l'amélioration des techniques de diffusion des connaissances

Il réunit des chercheurs des universités de Cergy Pontoise et de Versailles - Saint Quentin en Yvelines, des laboratoires scientifiques dépendant du Ministère de la Culture et de la Communication (MCC), du CNRS, du CEA, de l'Université Paris-XI, de grandes institutions patrimoniales comme le musée du Louvre, le château de Versailles, les Archives Nationales ou la Bibliothèque nationale de France, ainsi que de nombreux autres partenaires.

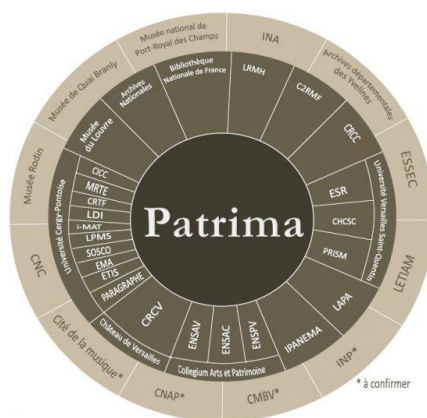


Figure 1 : Logo de la fondation des sciences du patrimoine - Patrima

Dans le cadre de la mise en place du LabEx, s'est tenue en 2011 une rencontre entre experts des différentes structures rattachées au LabEx Patrima.

A cette occasion, les Archives Nationales ont fait part de leurs difficultés, voire impossibilités à restaurer les couvertures d'ouvrages confectionnées en cuir et endommagées par la chaleur. La destruction est caractérisée par un brunissement, une rétraction ainsi qu'une forte augmentation de la rigidité du cuir. Ces phénomènes semblent exacerbés lorsque les cuirs sont, de plus, mis en contact avec de l'eau, ce qui peut être le cas lors d'une intervention sur un incendie. Par ailleurs, les effets de la chaleur s'ajoutent aux dommages préexistants qui peuvent être d'origines mécaniques, biologiques ou environnementales.

Cette problématique a été à l'origine d'un projet collaboratif d'étude entre deux laboratoires de recherche, le laboratoire du CRCC (Centre de Recherche sur la Conservation des Collections) spécialistes en science de la conservation des matériaux du patrimoine, dont le cuir, et le laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire–Cellules), spécialiste en biochimie des protéines dans des assemblages complexes et ayant des connaissances sur la peau et les brûlures. Le LabEx Patrima a financé un travail de thèse pour développer ce projet.

L'hypothèse de départ du projet repose sur la formation d'agrégats protéiques au sein du cuir suite à l'exposition à la chaleur. L'agrégation des protéines à la chaleur est un phénomène largement étudié dans la littérature lorsque ces macromolécules sont en solution ou dans divers milieux. Par contre la littérature sur la composition biochimique des cuirs chauffés est beaucoup moins abondante et le phénomène incomplètement décrit. Si une agrégation supplémentaire des protéines due à la chaleur est avérée, le développement d'un traitement de restauration biologique utilisant des molécules de type enzyme pourrait permettre la rupture de ces agrégats et ainsi redonner une partie de leur souplesse aux cuirs. Il pourrait constituer une alternative aux traitements issus de la chimie, plus respectueuse de l'histoire de l'objet et de son devenir.

Pour répondre à cette attente, les objectifs de cette étude étaient de (i) proposer un modèle d'exposition à la chaleur permettant de recréer artificiellement les principales modifications visuelles et de textures et ce de manière homogène (ii) d'identifier, caractériser et quantifier les modifications induites par l'exposition à la chaleur de cuirs de tannage végétal à différentes échelles de structure, (iii) proposer un support de restauration permettant l'inclusion d'une enzyme et caractériser son effet notamment sur les propriétés mécaniques des cuirs chauffés.

La première section de ce manuscrit, la revue bibliographique, est constituée de trois parties.

La première partie présente le cuir, elle s'intéresse à sa composition et structure, aux différentes étapes de fabrication ainsi qu'à l'impact de cette fabrication sur les constituants protéiques du cuir. L'acquisition de nouvelles propriétés de résistance suite au processus de fabrication sera présentée.

La deuxième partie de la bibliographie présente les altérations observées dans le cas du vieillissement naturel des cuirs. Les facteurs et mécanismes seront décrits et les principales méthodes de caractérisation de l'altération seront exposées.

La dernière partie est centrée sur les effets de la chaleur sur les cuirs, du niveau macroscopique aux niveaux microscopique et moléculaire. Les techniques de restauration et conservation actuellement mises en œuvre pour pallier les pertes de propriétés mécaniques seront abordées.

La deuxième section du manuscrit correspond à la section expérimentale où sont décrits les principes des techniques utilisées ainsi que les protocoles expérimentaux suivis.

Enfin la troisième section présente et discute les résultats obtenus à l'issue des travaux de thèse. Cette section est constituée de deux parties. La première présente les résultats de la caractérisation des effets de la chaleur sur des cuirs de tannage végétal au mimosa. Dans cette optique, nous avons élaboré un modèle d'exposition à une chaleur sèche. Les modifications induites par la chaleur à différentes échelles de structure ont pu être étudiées grâce à l'utilisation d'un panel de méthodes complémentaires physico-chimiques et biochimiques. La deuxième partie présente la stratégie développée pour concevoir et élaborer un support de restauration incluant des enzymes. Les effets du support choisi seront caractérisés et l'activité de l'enzyme étudiée.

L'étude, financée par le LabEx Patrima, a été réalisée en codirection entre le laboratoire ERRMECE EA1391 et le laboratoire du CRCC (centre de recherche sur la conservation des collections) et grâce à l'aide de laboratoires extérieurs à la codirection tels que le LPPI et le L2MGC (institut des biomatériaux -UCP), et la participation du laboratoire ICPI (Leather and Footwear Research Institute – Bucarest, Roumanie).

## Revue bibliographique



## PARTIE 1 : FABRICATION D'UN CUIR : LA PEAU ET SA TRANSFORMATION

Aujourd'hui considéré comme un matériau noble, le cuir entre dans la confection d'objets ou de vêtements en raison de ses propriétés de résistance, notamment mécanique et à la putréfaction.

Obtenu à partir de peaux, et plus précisément à partir du derme, le cuir est un matériau riche en collagène. Différents types de cuir peuvent être obtenus en fonction de l'espèce animale utilisée (veau, chèvre, mouton, poisson...) et du type de tannage effectué (tannage végétal ou minéral).

Dans cette étude bibliographique, la peau, matériau de base, ainsi que ses principaux constituants impliqués dans la fabrication du cuir seront d'abord présentés. Dans un second temps les étapes de fabrication d'un cuir seront abordées et enfin les propriétés des cuirs seront décrites.

Le cuir étant fabriqué uniquement à partir du derme de la peau, nous décrivons dans la prochaine partie ses constituants, et plus particulièrement le collagène de type I, le principal constituant protéique.

### **A. La peau : une structure composée majoritairement de protéines collagéniques**

La plupart des informations délivrées dans ce chapitre ont été décrites dans le cas d'une peau humaine, elles sont cependant applicables à la plupart des mammifères terrestres dont les bovins.

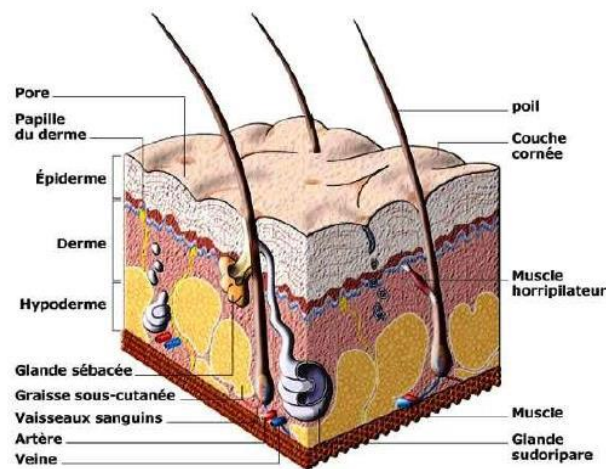
#### **I. LA PEAU, UNE STRUCTURE COMPLEXE**

Chez l'homme, la peau représente l'organe le plus étendu (près de 2m<sup>2</sup> de surface) et le plus lourd (entre 4 et 10 kg chez l'adulte) (Ménillet et Mordenti 2015). A titre de comparaison, chez le bovin adulte, sa surface représente plus du double (4,5m<sup>2</sup> en moyenne) et possède les caractéristiques anatomiques et histologiques communes aux mammifères.

La peau constitue un organe de protection de l'organisme contre l'environnement extérieur (micro-organismes, agressions physiques ou chimiques, rayonnement ultraviolet, température...). Elle participe également aux processus de thermorégulation, de perception sensorielle, de défense immunitaire et au métabolisme de synthèse de molécules (vitamine D, hormones, sébum). Son épaisseur est variable en fonction de l'âge de l'individu ou sa localisation, par exemple elle est plus fine au niveau des paupières et du pavillon de l'oreille. Chez le bovin, son épaisseur varie entre 3 et 7mm. Elle est épaisse dans les zones peu velues ou glabres et plus fine dans les zones à forte pilosité. Les variations saisonnières de pelage peuvent avoir des conséquences sur l'épaisseur de la peau (Roblin 1983).

Les constituants de la peau lui confèrent des propriétés d'élasticité et de souplesse lui permettant de s'adapter aux variations morphologiques de l'individu. D'un point de vue biochimique, la peau est

composée approximativement de 70% d'eau, 27% de protéines, 2% de lipides et 1% d'oligo-éléments. Sa structure est complexe, trois couches distinctes la constituent : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (cf **Figure 2**).



*Figure 2: Architecture de la peau. La peau se compose de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Ménillet et Mordenti 2015).*

**L'épiderme** constitue un épithélium de surface non vascularisé composé de 90% de kératinocytes et de 10% d'autres cellules dispersées entre les kératinocytes : les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Boulais et Misery 2008).

**Le derme** est un tissu conjonctif, composé majoritairement d'eau (80%) et extrêmement vascularisé et innervé. Il possède une fonction essentielle tant dans le soutien mécanique de l'épiderme qu'au maintien de sa viabilité (vascularisation, nutriments, facteurs de croissance). Il abrite les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les glandes cutanées et les follicules pileux. Le derme est constitué de deux couches distinctes : le stratum papillaire, tissu conjonctif lâche riche en fibres de collagène fines et isolées et, plus profond, le stratum réticulaire, tissu conjonctif dense représentant la majeure partie du derme où d'épaisses fibres de collagène sont enchevêtrées, organisées en faisceaux et composé également de fibres élastiques. De par sa composition le derme confère à la peau ses propriétés d'élasticité, de résistance et de souplesse. On trouve des constituants cellulaires, les principaux étant les fibroblastes et non cellulaires qui sont le collagène, l'élastine, les protéoglycanes et l'acide hyaluronique. Le derme contribue en grande partie à l'hydratation de la peau (Chen, Przyborowski, et Berthiaume 2009).

Les principaux constituants cellulaires du derme sont les fibroblastes, présents sous forme de cellules isolées. Leur rôle principal est de synthétiser une matrice extracellulaire dense conférant au derme ses propriétés mécaniques, notamment les précurseurs des molécules de collagène et d'élastine (Kierszenbaum 2006) ainsi que des polysaccharides ; ils sécrètent également des facteurs de croissance et des enzymes de remodelage.

Enfin, **l'hypoderme** est la couche la plus profonde de la peau, il est composé majoritairement de cellules grasses (adipocytes) ainsi que de fibroblastes ayant un rôle de soutien. Il constitue une réserve énergétique et permet une régulation thermique (diminution des flux de température avec

l'extérieur). Tout comme le derme, l'hypoderme est très vascularisé, il renferme les systèmes veineux et artériels (Chen, Przyborowski, et Berthiaume 2009).

Le cuir étant obtenu uniquement à partir du derme, nous nous intéresserons exclusivement à sa composition.

## II. CONSTITUANTS DU DERME

Le composé majoritaire du derme est le collagène qui constitue 70% de sa masse sèche, c'est pourquoi nous nous intéresserons plus particulièrement à cette protéine.

### II.1. LE COLLAGENE

Le mot collagène vient du grec « *kolla* » qui signifie colle (Voet et Voet 2005). Le collagène est une protéine fibreuse d'environ 300 nm de long, présente dans les tissus conjonctifs et les tendons. Cette protéine représente près de 30% des protéines chez l'homme où elle est majoritaire (Claverie, Panet, et Barbeau 2008). Le collagène représente 70% des protéines dermiques. Organisé en fibres insolubles et très résistantes, il confère leurs propriétés de résistance mécanique aux tissus conjonctifs tels que les os, les dents, les cartilages, les tendons, les ligaments, les matrices fibreuses de la peau et les vaisseaux sanguins (Voet et Voet 2005). Les fibroblastes, cellules principales du tissu conjonctif, sont à l'origine de la synthèse des molécules de (tropo)collagène. Le (tropo)collagène résulte de l'association de 3 chaînes polypeptidiques  $\alpha$  identiques (homotrimère) ou différentes (hétérotrimère) formant une structure hélicoïdale très riche en proline et glycine. Chaque chaîne  $\alpha$  est constituée d'une séquence en acide aminé de type « glycine-X-Y » où X et Y sont souvent la proline et l'hydroxy-proline, et plus rarement la lysine et l'hydroxy-lysine (Rich et Crick 1955). Dans 12% des cas l'enchaînement est de type : glycine –proline –hydroxyproline ; dans 44%, de type glycine-proline-Y ou glycine-X-proline et enfin dans 44% de type glycine-X-Y où X et Y sont non définis (Covington et Covington 2009) (**Figure 3**).

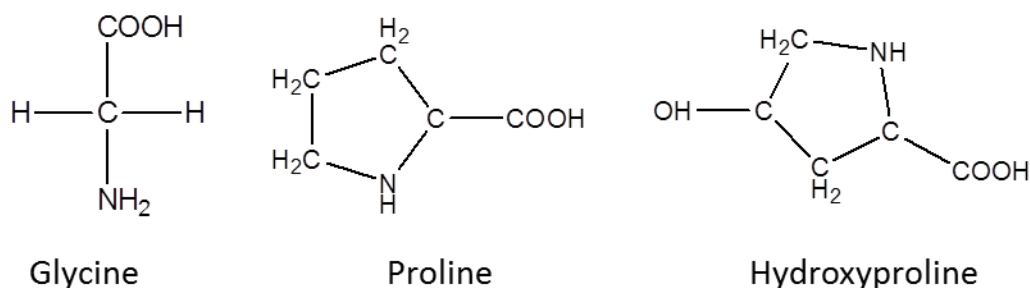


Figure 3 : structure des principaux acides aminés constitutifs de la molécule de collagène

L'enchaînement particulier de ces acides aminés favorise la structure hélicoïdale de la molécule de collagène. La glycine, acide aminé à chaîne courte, est le seul capable de prendre place au sein de l'espace encombré, au centre de la triple hélice, il est donc essentiel à la formation de la triple hélice (Lodish et al. 2005). Afin que cette dernière puisse s'assembler, les 3 chaînes sont décalées. Les groupements peptidiques décalés sont orientés de sorte que les groupements amine primaire (N-H)

de chaque glycine puissent établir une liaison hydrogène (H) « forte » avec l'oxygène du groupement carboxyle (COOH) d'une chaîne  $\alpha$  voisine (Rich et Crick 1955; Voet et Voet 2005) **Figure 4**.

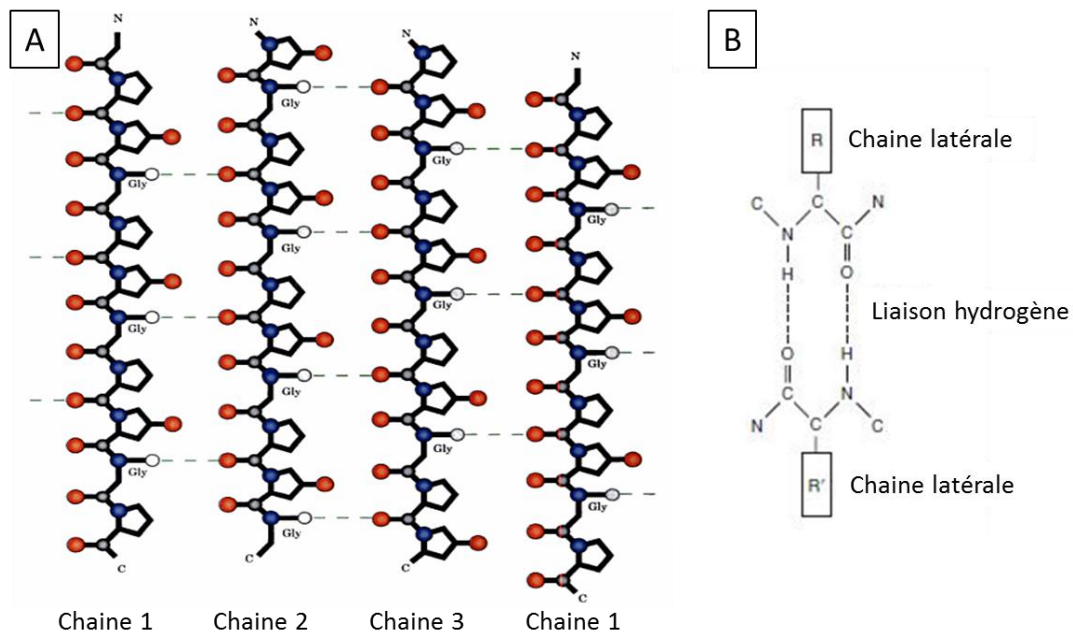


Figure 4 : [A] Représentation des liaisons hydrogène intermoléculaires au niveau des régions riches en Glycine (Gly) de la triple hélice de collagène. [B] Schéma de la liaison hydrogène (H) au niveau d'acides aminés (Voet et Voet 2005; Kite et Thomson 2006). [A] La chaîne 1 est répétée afin de réaliser une projection cylindrique. Les 3 chaînes sont décalées verticalement d'un résidu afin que les différents acides aminés Gly-X et Y des trois chaînes se retrouvent au même niveau. Les boules blanches symbolisent les groupements H, les boules rouges OH. La glycine (Gly) est représentée par une chaîne latérale circulaire blanche, la proline par un cycle et l'hydroxyproline par un cycle accompagné d'un groupement rouge.

Outre la stabilisation de la triple hélice par des liaisons hydrogène entre acides aminés des différentes chaînes  $\alpha$ , Figure 4, des interactions électrostatiques également appelées « salt-link » s'établissent entre groupements acides et basiques des chaînes latérales (Covington et Covington 2009). Ainsi, la triple hélice de collagène est maintenue grâce à de nombreuses interactions de faible énergie dont la stabilité dépend de l'éloignement des groupements réactifs. Elles sont d'autant plus fortes que les groupement seront proches (Kite et Thomson 2006).

Autres acteurs, les molécules d'eau jouent un rôle important dans la stabilisation de la triple hélice via les liaisons hydrogène, comme représenté dans la **Figure 5**. L'accumulation de molécules d'eau, intrinsèques à la molécule de collagène et en couches (à partir d'un résidu hydroxyproline), crée une gaine supramoléculaire de solvant et contribue à la stabilisation de la molécule de collagène native (Covington et Covington 2009).

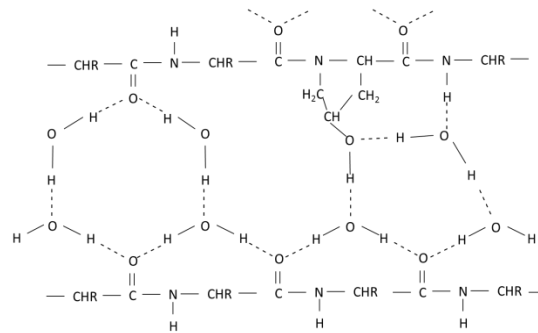


Figure 5 : *Modèle illustrant les liaisons hydrogènes intervenant entre les molécules de collagène et celles d'eau, permettant la stabilisation des molécules entre elles* (Covington et Covington 2009).

L'association des trois chaînes  $\alpha$ , de pas gauche, conduit à la formation d'une triple hélice droite (Voet et Voet 2005, Lodish et al. 2005). Les résidus proline et hydroxy-proline, de par leur conformation cyclique, sont davantage encombrants et empêchent les mouvements et les rotations, contribuant à la stabilité de la triple hélice et lui confèrent ses propriétés de rigidité (Kennedy et Wess 2003, Voet et Voet 2005).

On répertorie actuellement 29 types différents de collagène tous codés par des gènes distincts. Le collagène de type I est le plus fréquent, il représente 90% du collagène des mammifères et participe à la structure des tissus osseux et conjonctifs. A l'inverse certains collagènes sont spécifiques d'un tissu, tel que le collagène II du cartilage et de l'humeur vitrée de l'œil par exemple.

Le collagène de type I représente 60 à 80% des collagènes du derme alors que le collagène de type III compte pour 15 à 25% et le collagène de type V pour 2 à 5%. Dans le cas de notre étude, l'attention sera portée sur le collagène de type I, majoritaire au sein du derme.

Les collagènes de type I, II, III, V et XI sont dits fibrillaires car ils sont capables de s'auto-assembler pour former des fibrilles de forme cylindrique de diamètre compris entre 10 et 500nm. Le diamètre des fibrilles est dépendant de l'âge, du tissu et du type de collagène. Les collagènes fibrillaires de type I, III, et V s'auto-assemblent en fibres plus épaisses qui forment un réseau tridimensionnel organisé, inextensible dans toute l'épaisseur du derme. Ils confèrent à la peau sa résistance et sont essentiels à son intégrité.

Dans le cas de la peau les fibrilles de collagène ont un diamètre compris entre 40 et 100nm (Kennedy et Wess 2003). Au sein des fibrilles, les molécules de collagène sont alignées de façon non continue les unes derrière les autres. D'autre part, elles sont assemblées parallèlement les unes aux autres de façon décalées, avec un déplacement relatif de 67 nm, équivalent à environ un quart de la longueur de la molécule de collagène. Ce décalage de 67 nm est appelé période D intermoléculaire du collagène et peut être visible par analyse de microscopie électronique en transmission (Kennedy et Wess 2003; Lodish et al. 2005; Kite et Thomson 2006 ) (**Figure 6**).

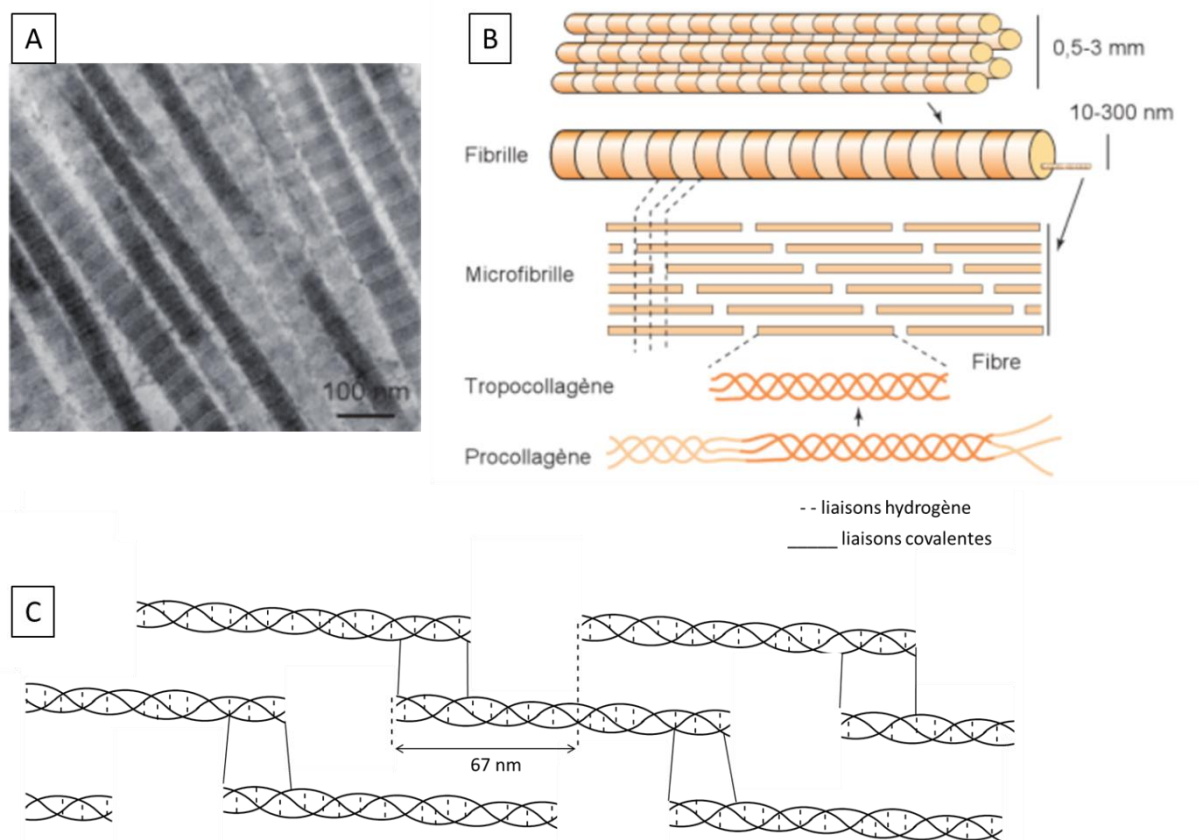


Figure 6 : [A] Observation de fibres de collagène au microscope électronique à transmission. [B] Schéma représentant l'arrangement des molécules en fibrilles. [C] Liaisons intermoléculaire au niveau des triples hélice de collagène et représentation de la période D intermoléculaire du collagène d'une longueur de 67nm. [A] et [B] Tirés de (Richard, Chevalet, et Soubaya 2014), [C] D'après (Yamauchi et Sricholpech 2012).

Les triples hélices de collagène sont maintenues les unes aux autres grâce à la présence de liaisons électrostatiques (salt link), liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes et covalentes (Covington et Covington 2009).

- Les liaisons électrostatiques, impliquant des interactions molécule d'eau- charge et charge-charge interviennent entre les chaînes latérales anioniques et cationiques le long de l'hélice  $\alpha$ , de même que dans le cas des liaisons hydrogène.
- Les interactions hydrophobes induisent une attraction de charge, provoquent une exclusion de l'eau et rendent les chaînes latérales électriquement neutres.
- Les interactions latérales entre deux molécules de collagène sont stabilisées par la présence de liaisons covalentes. Ces liaisons covalentes entre molécules de (tropa)collagène adjacentes sont permises grâce à l'action d'une enzyme : la lysyl oxydase ( Voet et Voet 2005, Kierszenbaum 2006). Cette enzyme, seule à être impliquée dans ce processus de réticulation, a la capacité de transformer les résidus lysine (Lys) en résidus aldéhyde allysine permettant la création de liaisons covalentes selon un mécanisme complexe décrit sur la **Figure 7**.

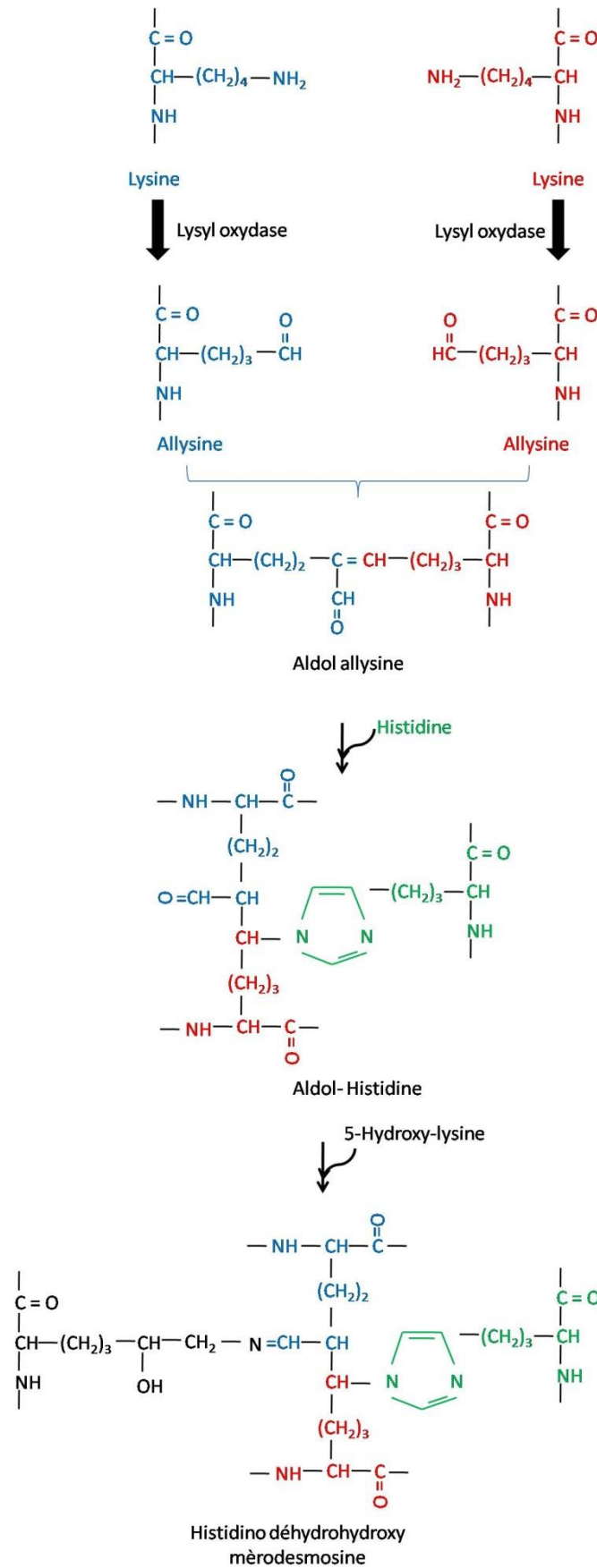
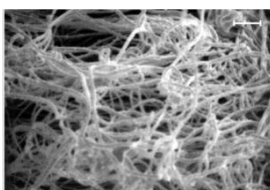
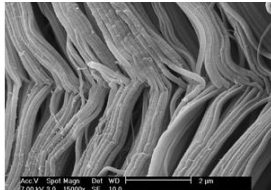
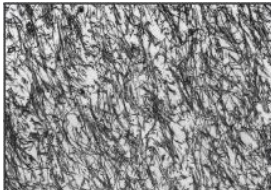
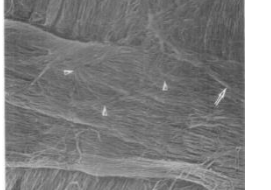


Figure 7 : Mécanisme d'action de la lysyl oxydase aboutissant à la formation d'une liaison covalente entre deux résidus lysine de la chaîne de collagène (Voet et Voet 2005).



Au maximum quatre chaînes latérales de collagène peuvent être liées de façon covalente les unes aux autres. Ces liaisons se forment au niveau des zones de chevauchement, au niveau des télopeptides (région non hélicoïdale au niveau terminal de la triple hélice) entre la région N-terminal d'une molécule de collagène et la région C terminal d'une molécule de collagène adjacente (Lodish et al. 2005, Covington et Covington 2009).

L'arrangement des fibrilles de collagène est dépendante du type de tissu comme décrit dans le **Tableau 1** (Voet et Voet 2005).

Tissu étudié			
Peau	Tendon	Cartilage	Cornée
Arrangement des fibrilles de collagène			
Feuillets de fibrilles disposés en couches d'orientations diverses	Parallèles	Aucun arrangement particulier	Feuillets plans entrecroisés
			
Collagène de peau humaine (MEB) (Fligiel et al. 2003)	Collagène de tendon de rats (MEB) (Raspanti et al. 2005),	Collagène de cartilage articulaire humain (MET) (Eyre 2002)	Collagène de cornée humaine (MEB) (Komai et Ushiki 1991)

*Tableau 1 : Arrangement des fibrilles de collagène au niveau de différents tissus (peau, tendon, cartilage et cornée).*

Certains composants non collagéniques de la peau ont également leur importance lors de la confection des cuirs. Dans cette partie ne seront abordés que les constituants impliqués dans la transformation de la peau en cuir.

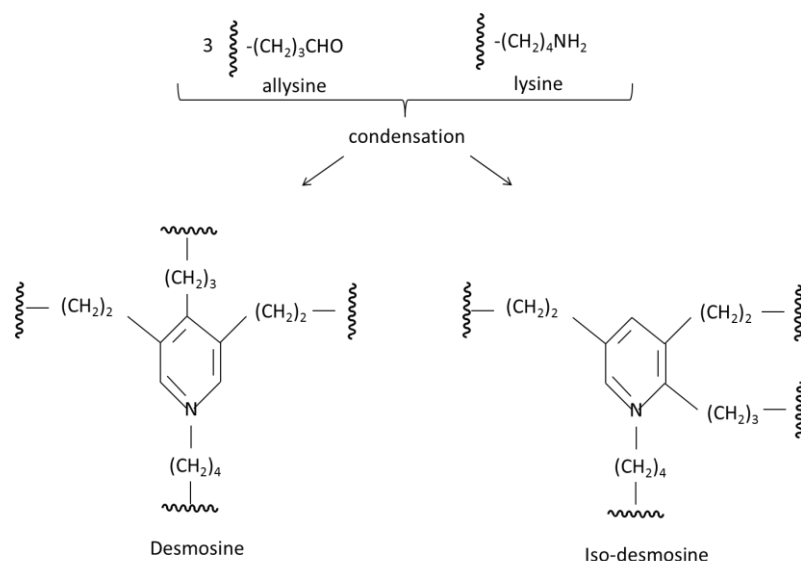
## II.2. L'ELASTINE

La seconde protéine la plus importante dans la peau est l'élastine, présente dans tous les tissus nécessitant une élasticité : ligaments, artères, tissus pulmonaires (Moussard 2006).

Principal composant des fibres élastiques, l'élastine est une protéine hydrophobe qui comme le collagène est produite par les fibroblastes. Les molécules d'élastine s'assemblent en filaments et en feuillets par réticulation. La structure enroulée de l'élastine est aléatoire et se modifie après chaque étirement. Les molécules d'élastine sont liées entre elles grâce à des liens covalents leur permettant de s'étirer et de s'enrouler de façon réversible (Stevens et Lowe 1997). La réticulation se fait par des



ponts lysine entre molécules (Moussard 2006) et plus particulièrement par l'intermédiaire de groupements desmosine et iso-desmosine. En effet, dans ce cas la liaison covalente formée est aromatique et résulte de la condensation de trois chaînes latérales de type allysine avec une chaîne latérale de lysine comme illustré dans le schéma ci-dessous (**Figure 8**) (Covington et Covington 2009).



*Figure 8 : Représentation schématique d'une desmosine et d'une iso-desmosine. D'après (Covington et Covington 2009).*

A une échelle macroscopique, les molécules d'élastine forment un réseau réticulé dont la conformation est désordonnée et aléatoire. Au sein de ce réseau les régions hydrophobes se regroupent, excluant l'eau. Lorsque le réseau est étiré les zones hydrophobes se retrouvent en contact avec l'eau (Covington et Covington 2009).

L'élastine participe aux propriétés physiques et mécaniques de la peau et du cuir. Les fibres d'élastine possèdent la capacité de s'étendre lorsqu'elles sont étirées et de se contracter et revenir en position de repos lorsque la tension est supprimée. Elles sont localisées au niveau des follicules, où de grosses fibres sont arrangées de façon parallèles à la surface de la peau tandis que des fibres plus fines sont placées de façon orthogonale (Covington et Covington 2009).

D'un point de vue chimique, la comparaison des taux des différents acides aminés constitutifs de l'élastine montrent une certaine analogie avec la molécule de collagène. De façon grossière, la molécule d'élastine est composée d'environ 1/3 de glycine, de proline, pas de cystéine, mais diffère par l'absence de motif répété et la faible teneur en résidus hydroxylés. La comparaison de la teneur en certains résidus entre les molécules d'élastine et de collagène est présentée dans le **Tableau 2** ci-dessous. (Moussard 2006; Covington et Covington 2009).

Acide aminé nombre de résidus / 1000	Collagène	Elastine
Glycine	<b>330</b>	<b>355</b>
Proline	<b>126</b>	<b>125</b>
Hydroxyproline	93	23
Hydroxy	57	20
Acides aminés apolaires	170	431
Acides aminés acides	120	14
Acides aminés basiques	96	10

Tableau 2 : Comparaison de la teneur en différents acides aminés sur un total de 1000 résidus, entre le collagène et l'élastine.

Il peut être noté que l'élastine est une protéine thermostable, permettant de l'isoler facilement du collagène. L'élastine est une protéine particulièrement résistante et très difficilement dégradée. Elle est cependant sensible à l'hydrolyse chimique par l'acide oxalique et par l'hydroxyde de potassium et à l'hydrolyse enzymatique par des élastases, telles que la MMP-2 (= gélatinase A), la MMP-9 (=gélatinase B), la MMP-7 (=matrilysine) ou la MMP-12, l'élastase des macrophages. *In vivo*, le renouvellement de l'élastine est quasi nul et son temps de demi-vie est estimé à 70 ans.

### II.3. LA FIBRONECTINE

La fibronectine est une glycoprotéine présente au sein de la matrice extracellulaire capable de se lier à différents partenaires pour former des réseaux. Elle est constituée de deux sous unités homologues de 250kDa chacune. Chacune des deux sous unités est formée de douze modules de type I, deux modules de type II et quinze modules de type III. Son épissage alternatif permet l'obtention de différentes isoformes.

La fibronectine est capable de se lier à différents partenaires moléculaires tels que des protéines matricielles dont le collagène, des polysaccharides ou des enzymes, grâce à la présence de domaines d'affinité spécifiques et ainsi aboutir à la formation de réseaux (**Figure 9**). Parmi les partenaires possibles peuvent être cités les collagènes de type I et III ou encore la fibrine. La formation d'un réseau fibronectine-fibrine joue un rôle dans le processus physiologique de réparation cutanée en formant un support pour la migration cellulaire (notamment les fibroblastes) (Hubmacher et al. 2011).

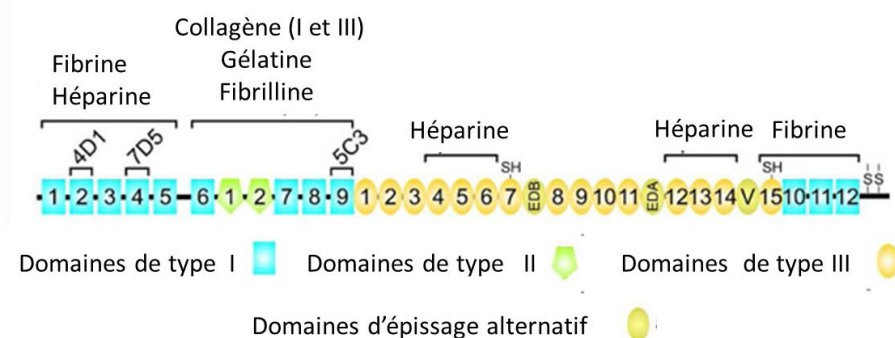


Figure 9 : Structure d'une des sous unités de la fibronectine, et séquences d'interaction de la fibronectine à différentes molécules. D'après (Hubmacher et al. 2011).

#### II.4. L'ACIDE HYALURONIQUE ET LES GAGS

Au sein de la peau (mais également des autres tissus conjonctif comme les tendons, les vaisseaux sanguins et le cartilage), les fibres de collagène et d'élastine sont au sein d'une matrice gélifiée composée en majeure partie de glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs font partie de la famille des polysaccharides ; et dans la peau on retrouve l'acide hyaluronique (AH, GAG non sulfaté), la chondroïtine 6 sulfate, le dermatane sulfate présent dans la peau en diverses proportions avec la chondroïtine 4 sulfate, le keratane sulfate et l'héparine qui joue un rôle dans les processus de cicatrisation en inhibant la coagulation du sang et empêchant la formation et l'introduction de caillot sanguin au sein de la circulation sanguine (Voet et Voet 2005).

L'AH est une molécule fortement hydratée et sa structure moléculaire lui confère une propriété de rigidité. Par ailleurs il lie fortement les cations tels que  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ .

Les différents constituants du derme et plus particulièrement le collagène sont impliqués dans la transformation de la peau en cuir. Dans un deuxième temps, nous proposons d'étudier les différentes étapes de transformation d'une peau en cuir ainsi que leurs conséquences au niveau biochimique/protéique.

Dans la partie suivante seront abordées les différentes étapes permettant la transformation d'une peau en cuir.

## **B. De la peau au cuir : les techniques de transformation et l'acquisition de nouvelles propriétés**

Le processus permettant d'obtenir un cuir c'est-à-dire une peau imputrescible et résistante à l'eau (Dupont et Mathieu 1981) implique une transformation de la peau et l'élimination d'une partie de sa structure par des méthodes chimiques et mécaniques. Comme indiqué précédemment le cuir est fabriqué à partir du derme et est composé majoritairement de collagène de type I. Le cuir présente deux faces distinctes : la face fleur correspond au derme papillaire, partie externe précédemment en contact avec l'épiderme, et la face chair au derme réticulaire. Chacune des étapes du processus de transformation des peaux en cuir participe à la modification ou à l'élimination des constituants de la peau. La majorité des informations obtenues sur le sujet sont tirées d'un ouvrage de référence : *Tanning chemistry : the science of leather* par A.D.Covington et T.Covington.

Les étapes de transformation de la peau en cuir seront traitées selon un ordre chronologique.

### **I. LES ETAPES DE FABRICATION**

La peau récupérée en sortie d'abattoir, utilisée pour la confection d'un cuir est appelée « cuir vert » (Mann 1978). Dans un but de conservation dans l'attente du processus de transformation, les peaux sont généralement séchées.

#### **I.1. LE SECHAGE DES PEAUX**

Il existe différentes techniques de séchage du cuir vert : à l'air libre (par suspension ou au sol) ou bien par des techniques de salage (saumurage, salage humide, ou par salage à sec) (Mann 1978; Viñas et Viñas 1992). En abaissant le taux d'humidité de la peau, le séchage permet d'empêcher sa putréfaction. Dans les conditions optimales le taux d'humidité est abaissé à un pourcentage massique de 40% (Kennedy et Wess 2003).

Lors du séchage à l'air libre, l'humidité contenue à l'intérieur de la peau va diffuser vers la surface et s'évaporer. Les conditions de séchage optimales sont obtenues lorsque le taux d'évaporation ( $K_e$ ) et de diffusion ( $K_d$ ) sont similaires. Lorsque les cinétiques de ces deux processus sont différentes ( $K_e < K_d$  ou  $K_e > K_d$ ) le développement de bactéries au cœur du matériau est à craindre. Par ailleurs si  $K_e > K_d$ , les couches supérieures du matériau sèchent complètement ce qui provoque un encollage des fibres de collagène qui deviennent fragiles et cassantes (Covington et Covington 2009).

Le séchage par salage aujourd'hui privilégié, repose sur l'application du chlorure de sodium (sel en grain, sel gemme, sel de mer...). Les peaux salées peuvent être empilées les unes sur les autres (gain de place) et peuvent être conservées ainsi pendant plusieurs mois.

Le sel ne doit pas contenir plus de 0,01% de fer et plus de 0,1% de calcium et magnésium. Ces cations peuvent réagir avec les groupements phosphate et carbonate présents dans la peau et provoquer des défauts appelé « points durs / hard spots », en particulier sur les peaux de veau. En causant la déshydratation et le repliement des fibres de la peau ainsi qu'en empêchant les mouvements de solutions au sein de la structure, le sel a un effet bactériostatique (croissance bactérienne suspendue).

## I.2. LA TREMPE

L'étape succédant au salage est celle de la trempe. Elle permet d'enlever les sels présents (si utilisés lors du séchage), de réhydrater la peau, d'aérer la structure en séparant les fibres des faisceaux de fibrilles et d'ôter les composants non collagéniques de la peau notamment les GAGs (dont l'AH) et les protéines non structurales (Covington et Covington 2009).

Le temps minimum requis pour permettre un dessalage efficace et une réhydratation jusqu'au cœur du matériau lui restituant sa structure est de 6 heures et est habituellement compris entre 24 et 48 heures. La température du bain doit être située entre 20 et 30°C pour des conditions optimales. Aucun changement de pH n'est nécessaire (neutre) mais les tanneurs préfèrent parfois alcaliniser le bain jusqu'à pH 10 par ajout d'une solution composée de carbonate de sodium pour faciliter l'action de mouillage (Covington et Covington 2009).

Les peaux obtenues à la fin de l'étape de la trempe sont dites « reverdies », elles sont ramollies et débarrassées de leurs impuretés. Cette étape permet de faciliter la pénétration des agents chimiques qui seront utilisés par la suite (Mann 1978).

Le type de séchage employé (à l'air libre ou par salage) a une importance lors du processus de trempe. Bien que les molécules d'AH ne soient pas liées au collagène, à pH physiologique, les groupements carboxyliques aliphatiques se trouvent sous la forme ionisée impliquant un volume d'exclusion important dû aux répulsions de charge. Par conséquent, elles se trouvent dans un environnement au sein duquel elles ne peuvent se substituer. En présence de sels, les charges sont écrantées, la molécule d'AH peut alors se contracter et ainsi être ôtée de la structure lors du lavage. Dans le cas de peaux séchées à l'air, ce mécanisme ne peut avoir lieu et il est nécessaire d'ajouter des sels dans les bains de trempe ou d'augmenter la durée de l'étape ultérieure de chaulage. A la fin de cette étape, le derme ne contient presque plus de composés polysaccharidiques, sa composition biochimique est majoritairement protéique.

## I.3. PELANAGE, EBOURRAGE, ECHARNAGE

Après les étapes de séchage et trempage, les peaux sont ensuite chaulées (pelanage), ébourrées et écharnées (Mann 1978). L'étape de chaulage consiste à tremper les peaux dans une solution au pH très alcalin (12-13) à base de chaux. Dans ces conditions les peaux immergées gonflent. La durée est adaptée selon l'épaisseur (une quinzaine de jours), afin que la graisse, la chair et les poils se détachent plus facilement (Viñas et Viñas 1992).

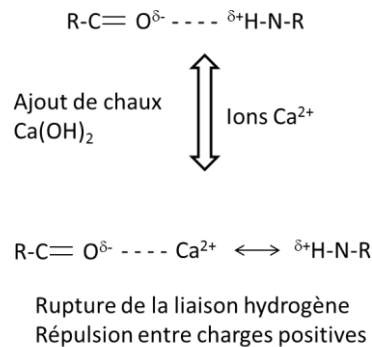
L'étape de chaulage a de nombreuses conséquences notamment aux niveaux protéique et lipidique :  
**-Rupture des liaisons électrostatiques** : lors du processus de chaulage, le milieu très alcalin provoque une rupture des liaisons de type électrostatique en rendant les protéines anioniques.



En absence de ces interactions la structure se déplie, permettant son hydratation ce qui provoque un gonflement.

**-Rupture des liaisons hydrogène :** en présence de chaux ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) les ions calcium rompent les liaisons hydrogène (**Figure 10**) ce qui entraîne une répulsion entre charges positives et par conséquent le gonflement de la molécule de collagène.

Liaison hydrogène entre groupements



*Figure 10 : Rupture des liaisons hydrogène par ajout d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) lors du processus de chaulage (Covington et Covington 2009).*

**-Hydrolyse des liaisons peptidiques.** Les effets sont différents selon le type de protéine considéré. Dans le cas des protéines dites non structurales, de type linéaire, l'hydrolyse des liaisons peptidiques va engendrer la formation de petits fragments protéiques qui peuvent s'échapper de la structure. Sur le collagène, dont la structure protéique est plus complexe et l'ultrastructure stabilisée par un grand nombre d'interactions, l'action du chaulage est moins importante. En effet, un grand nombre de liaisons peptidiques doivent être rompues avant que les dommages soient observés de manière significative.

**-Hydrolyse des chaînes latérales amides.** Elle a pour conséquence la conversion d'acides aminés neutres : l'asparagine et la glutamine, en acides aminés acides : l'acide aspartique et l'acide glutamique. Ce phénomène entraîne une modification du point isoélectrique. La réaction est mentionnée dans le schéma ci-dessous (**Figure 11**).

Dans le cas d'un chaulage classique dont la durée est de 18 heures, près de la moitié des groupements amides disponibles ont été hydrolysés ce qui entraîne une diminution du point isoélectrique de la molécule de collagène de pH 7,4 (physiologique) à environ pH 5-6.

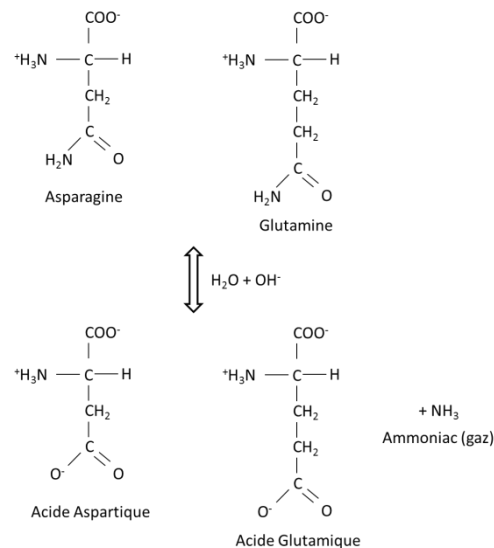


Figure 11 : Mécanisme d'hydrolyse des chaînes latérales amides lors du chaulage aboutissant à la transformation de l'asparagine et de la glutamine en acide aspartique et acide glutamique respectivement, accompagnée d'une libération d'ammoniac (Covington et Covington 2009).

**-Hydrolyse du squelette carboné et rupture des zones cristallines.** Le milieu très alcalin dans lequel se trouvent les protéines lors du chaulage provoque également une hydrolyse du squelette carboné des protéines. Les ruptures de la chaîne protéique engendrent une relaxation de la structure. Ce phénomène, accompagné d'une racémisation de certains résidus de la forme L à D avec augmentation de la distance inter résidus, entraîne une rupture locale des zones cristallines (Maxwell, Wess et Kennedy 2006).

**-Hydrolyse de la graisse.** Cette étape conduit à la formation de glycérol et de savon (**Figure 12**).

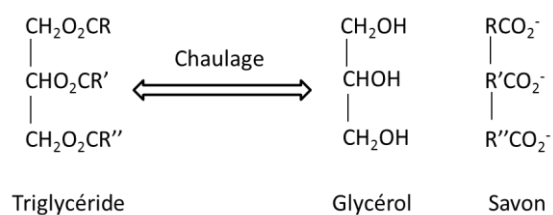


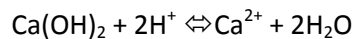
Figure 12 : Transformation des triglycérides en glycérol et savon au cours du chaulage (Covington et Covington 2009).

Une fois le processus de chaulage réalisé, la chair et les poils se détachent plus facilement. L'ébourrage permet d'enlever les poils et l'écharnage consiste à enlever la graisse à l'aide d'un couteau, ce qui permet de resserrer la structure des fibres de la peau et par conséquent de diminuer sa porosité (Mann 1978).

De nos jours, le processus d'ébourrage peut être assisté par des enzymes. L'utilisation d'enzymes stables et actives dans des conditions de pH alcalin est primordiale. Par ailleurs il est important de choisir des enzymes n'ayant pas d'activité collagénolytique afin de ne pas endommager les molécules de collagène. L'utilisation de la kératinase produite par *Thermoactinomyces sp RM4* (Température optimale 80°C, pH optimum : 10) permet l'hydrolyse des protéines de kératine du poil et facilite son retrait. L'élastase produite à partir du gène *LasB* de *Pseudomonas aeruginosa*, MCM B327 est également utilisable. Elle possède un fort potentiel dépilatoire sans avoir d'activité collagénolytique (Amit Verma et al. 2011, Pandeeti et al. 2011).

#### I.4. LE DECHAULAGE

L'étape de déchaulage consiste en une acidification en deux temps et permet d'éliminer la chaux. Le pH est d'abord abaissé de 12,6 à 8,5 - 9,0 pour permettre l'action de protéases. Il est ensuite abaissé jusqu'à une valeur de 2.5-3.0 nécessaire lors de l'étape de décapage et de tannage (notamment pour le tannage au chrome). La baisse de pH neutralise les résidus alcalins comme indiqué dans la réaction décrite ci-dessous.



L'étape de déchaulage permet également d'inverser partiellement le phénomène de gonflement. Au niveau visuel, la peau s'opacifie, la coloration des fibres de la peau réapparaît. Les protéines dégradées lors de l'étape du chaulage ainsi que les autres produits de la réaction de chaulage sont éliminés lors du rinçage.

Différentes solutions peuvent être utilisées lors du déchaulage :

- **L'eau** : le rinçage à l'eau permet la dilution des ions hydroxyles et leur neutralisation. Cette technique n'est pas privilégiée car elle demande beaucoup d'eau et peut provoquer un sur-gonflement du derme.
- **Les acides forts** : à l'exception des acides sulfurique et phosphorique dont les contre-ions interagissent avec le calcium et forment des sels insolubles au sein du derme. Une addition d'électrolyte neutre est recommandée pour éviter le gonflement acide de la peau, l'abaissement du pH en dessous de 5 est proscrit.
- **Les acides faibles** : en particulier l'acide lactique ( $\text{CH}_3\text{CH(OH)CO}_2\text{H}$ ) qui produit des sels de calcium solubles
- **Les sels acides** : comme le sodium métabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) qui permet de récupérer les résidus sulfurés après l'étape de chaulage.
- **Les sels d'ammonium** : tels que le sulfate d'ammonium et le chlorure d'ammonium pour abaisser le pH à 9 et favoriser l'activité des enzymes pancréatiques utilisées lors du confitage (étape permettant la dégradation par voie enzymatique des protéines non structurales). Cependant les sous-produits ammoniaqués sont toxiques.



## I.5 LE TANNAGE

Le tannage est l'étape clé qui permet d'obtenir un cuir, c'est-à-dire de rendre les peaux imputrescibles (Covington et Covington 2009), résistantes à l'eau (Chahine 2013) et leur confère des propriétés de résistance (microbiologique, à la chaleur, mécanique...).

Il existe différents types de tannage. Historiquement, des tannins d'origine végétale -dont le tan d'écorces de chêne à l'origine du nom tannage- étaient employés le plus souvent (Halasz-Csiba 2002), en particulier pour la confection des objets du patrimoine, dont les reliures en cuir (Viñas et Viñas 1992). Bien que le processus de tannage végétal soit simplifié par l'utilisation d'extraits végétaux tannants concentrés qui raccourcissent la durée du tannage (elle ne dépasse pas un mois actuellement contre 12 à 18 mois auparavant), il est peu utilisé de nos jours (Richardin et al. 1988) et est remplacé par d'autres types de tannage : minéral (à l'alun), à la graisse (Halasz-Csiba 2002), ou encore synthétique qui sont utilisés depuis le XIXe siècle (Jullien et Durande-Ayme 1998). Depuis les 50 dernières années le tannage aux sels de chrome est le type de tannage privilégié par l'industrie du cuir (Covington et Covington 2009).

Un tannage réussi dépend de divers paramètres. Le processus d'agrégation des protéines avec les tannins est dépendant du taux d'hydratation du matériau, par conséquent la durée de trempage des peaux a un impact direct sur les températures de dénaturation et les échantillons les plus secs se contractent moins rapidement. La température joue également un rôle. Les tannins condensés ont la capacité à s'agréger entre eux grâce à des interactions de type électrostatique et des forces de van der Waal's, formant un précipité insoluble trop volumineux pour pénétrer au sein de la peau. Une élévation de la température permet de rompre ces agrégats et de procéder au tannage. Il faut cependant que la température n'entraîne pas d'agrégation ou de contraction du collagène.

Par ailleurs, certains tannins sont plus astringents que d'autres. Les tannins dits doux sont issus du gambier ou du myrobolam, les tannins dits astringents sont obtenus à partir de mimosa ou manguier. L'immersion d'une peau dans un bain de tannage trop concentré provoque un tannage excessif en surface ce qui empêche les tannins de pénétrer en profondeur. Il est préférable d'utiliser des tannins doux, puis astringents pour ne pas provoquer de contraction des fibres responsable d'un cuir cassant au niveau de la face fleur et qui sera tanné uniquement en surface (Mann 1978).

Par la suite, seul le tannage végétal, fréquemment utilisé pour les objets du patrimoine, sera abordé plus en détail.

## I.6. LA TEINTURE

Dans le cas d'un tannage végétal, le cuir a une coloration naturelle qui dépend du type de végétal utilisé allant du beige crème pour le tara au brun foncé pour le châtaignier, les tannins condensés donnent une teinte rougeâtre. A la suite du tannage, le cuir peut être teint, mais l'usage de colorants sur les cuirs de tannage végétal doit tenir compte de la couleur naturelle du cuir.

Il existe différents types de teinture (acide, basique, métallisée, sulfurée) qui présentent des mécanismes de fixation différents faisant intervenir des liaisons électrostatiques et/ou covalentes.

La présence des polyphénols, présents en grande quantité et fixés par les liaisons de faibles énergies, voire également par des liaisons covalentes (cas des tannins condensés) vont bloquer la plupart des

sites de fixation des colorants qui sont contraints de se lier au moins partiellement aux molécules de tannins provoquant une modification de la couleur du cuir.

Le processus de coloration peut également être assisté par une enzyme : la collagénase. Cette enzyme permet une coupure du réseau au niveau des fibres de collagène. Ceci entraîne une augmentation de la surface de contact permettant une meilleure pénétration de l'agent colorant au sein du cuir (Kanth et al. 2008).

#### I.7. LA LUBRIFICATION

La lubrification du cuir joue un rôle important en permettant d'obtenir un cuir à la fois souple et résistant. Le processus consiste à appliquer sur le cuir une émulsion, de type huile dans eau, composée d'un solvant (eau), d'un agent émulsifiant et d'une huile d'origine animale, végétale, synthétique voire dans quelques cas minérale.

A la fin de l'étape de tannage le cuir est gorgé d'eau. Le premier objectif de la lubrification est d'éviter les phénomènes d'encollement des fibres lors du séchage du cuir au cours duquel l'eau interfibrillaire est évaporée de la structure, provoquant un rapprochement des éléments du cuir. En gainant d'huile les fibres, le lubrifiant leur permet de continuer à se mouvoir les unes par rapport aux autres. L'efficacité de la lubrification du cuir dépend de la capacité de pénétration de l'émulsion au sein de la structure fibreuse du cuir, ainsi que de sa capacité à permettre le glissement des fibres contractées. L'efficacité de la lubrification dépend du pH du cuir (l'émulsion est souvent anionique telle que l'huile de pied de bœuf), de la taille et la répartition des micelles dans l'émulsion, du rapport émulsifiant/huile et de la viscosité des huiles.

Enfin, l'application d'un lubrifiant tel que la graisse permet d'augmenter la résistance du cuir à l'eau.

#### I.8. LE SECHAGE

Le cuir renferme trois types d'eau distincts : l'eau dite libre, l'eau liée qui forme une gaine extrêmement fine autour des molécules et l'eau de structure. Les différentes eaux vont être évaporées dans cet ordre.

Les conditions de séchage, dernière étape du processus de transformation de la peau en cuir, conditionnent les propriétés de souplesse du cuir. Dans le cas où la température est trop élevée, la vitesse d'évaporation est plus rapide que la vitesse de diffusion de l'eau depuis la structure interfibrillaire jusqu'à la surface, les fibres de surface sont réticulées de manière irréversible et l'eau de structure des fibres perdue. Une réhydratation ne permet pas dans ce cas à restituer au cuir son eau de structure.

Dans le cas où le cuir est séché en condition d'humidité contrôlée, un gradient de vapeur d'eau se crée via le processus de diffusion et la vitesse de séchage est ralentie. Si le taux d'humidité relative est suffisant pour empêcher la substitution de l'eau de structure, le séchage même à haute température n'aura pas d'effets indésirables sur la souplesse du cuir.

De nos jours, afin de limiter l'impact néfaste sur l'environnement du processus de fabrication d'un cuir notamment la pollution des eaux, une approche plus écologique (« ecofriendly ») est développée (Pandeeti et al. 2011). Elle se base sur l'utilisation d'enzymes pour assister voire remplacer les produits chimiques. L'utilisation d'enzymes permet également de traiter les restes de peaux et les

déchets de l'industrie du cuir car seulement 20% des peaux salées seront transformées en cuir. Le cuir étant composé majoritairement de collagène, il est intéressant de le biodégrader à l'aide de protéases telles que des collagénases (Aftab, Hameed, et Ikram-ul-Haq 2006, Teramura et al. 2011).

L'étape principale de transformation du derme en cuir est le tannage. Nous décrirons dans la partie suivante les différents tannins végétaux (type de tannins utilisés dans notre étude) et leurs réactions avec les composés protéiques du derme, collagène en particulier, ces réactions étant à l'origine des propriétés mécaniques du cuir.

## II. LES REACTIONS AU COURS DU TANNAGE

### II.1 LES TANNINS VEGETAUX

Les tannins sont présents naturellement au sein des végétaux au niveau de l'écorce, du bois, des racines, des feuilles, des galls ou des fruits (Richardin et al. 1988). Leurs propriétés astringentes constituent un mécanisme de défense des végétaux contre leurs prédateurs (insectes et les animaux) en leur conférant un goût peu agréable.

Les polyphénols, constituants principaux des tannins, sont issus de plantes. Ils possèdent un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da et sont utilisés afin de stabiliser les molécules de collagène de la peau. La capacité des polyphénols à interférer avec les protéines dépend directement de la teneur en hydroxyle phénolique. Le pouvoir astringent est conféré aux tannins par leur caractère acide. Un test simple, basé sur le phénomène de précipitation de la gélatine en solution en présence de tannins permet d'observer le caractère astringent d'un tannin. Ce dernier est dépendant du type de végétal utilisé (Chahine 2013).

Les tannins végétaux peuvent être séparés en deux classes selon leurs caractéristiques et leurs structures chimiques : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

Ces deux types de tannins sont présents au sein d'espèces végétales distinctes. Les tannins hydrolysables sont rencontrés dans les feuilles de sumac, les fruits du myrobolam, les écorces du châtaignier. Les tannins condensés peuvent être issus des écorces de chênes, de mimosa, de pin et de sapin ou encore du bois du quebracho (Richardin et al. 1988; Chahine 2013). Il peut également être noté que certains végétaux renferment à la fois des tannins hydrolysables et condensés comme l'acacia, l'érable, le hêtre, le châtaignier (Mueller-Harvey 2001) ou encore les écorces d'épicéa (Chahine 2013). Le **Tableau 3** compare les pourcentages respectifs de tannins et non tannins présents au sein de deux cuirs de tannins hydrolysables (sumac et myrobolam) et de tannin condensés (mimosa et chêne).

	Type	% tannins	% non-tannins
Feuilles de sumac	Hydrolysable	24	16
Myrobolam (fruit)	Hydrolysable	34	14
Ecorce de mimosa	Condensé	35	11
Ecorce de chêne	Condensé	10	5,5

Tableau 3 : Comparaison des pourcentages respectifs de tannins et non tannins présents au sein de cuirs de tannage hydrolysable (sumac et myrobolam) et de tannin condensés (mimosa et chêne).

### II.1.1. Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des composés saccharidiques dont l'unité de base est le glucose et qui possèdent une structure de polyesters (Kite et Thomson 2006). Ils peuvent être hydrolysés sous l'effet d'un acide dilué ou par saponification ou encore sous l'action d'une enzyme : la tannase d'*Asperillus Niger* ou une diastase (Richardin et al. 1988; Jullien et Durande-Ayme 1998). Leur hydrolyse conduit à la libération de fractions glucidiques ou poly-alcooliques ainsi que d'acides carboxyphénoliques (Richardin et al. 1988). On peut ainsi distinguer deux catégories principales de tannins hydrolysables : les gallotannins et les ellagitannins.

- **Les gallotannins** sont composés d'un polyol central, tel que le glucose, entouré par plusieurs unités d'acide gallique liées entre elles par des liaisons ester (« depside bond »), **Figure 13**. La **Figure 14** représente la structure d'un gallotannin. Leur hydrolyse conduit principalement à la libération d'acide gallique. Les gallotannins simples, rares dans la nature, sont le constituant majeur des acides tanniques disponibles dans le commerce (Mueller-Harvey 2001).

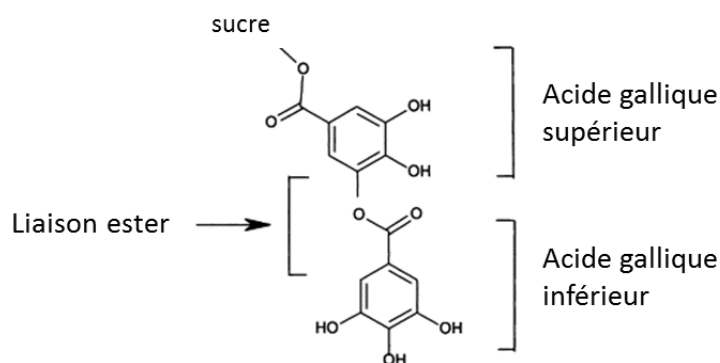


Figure 13 : Structure chimique des tannins hydrolysables de type gallotannins (Mueller-Harvey 2001).

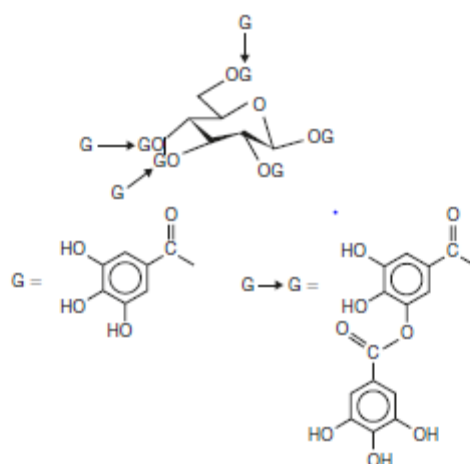


Figure 14 : Structure d'un type de tannins hydrolysables : les gallotannins (Covington 1997).

- **Les ellagitannins** sont des tannins plus complexes, ils résultent de la biosynthèse entre un pentagalloylglucose et des unités d'acide gallique par des réactions de type oxydatives. Leur hydrolyse aboutit à la libération d'acide gallique, d'acide ellagique ainsi que d'autres acides phénoliques.

Les tannins hydrolysables interagissent avec la molécule de collagène exclusivement via des liaisons hydrogène. Par conséquent un « détannage » des cuirs est possible par action d'agents capables de rompre les liaisons hydrogène tels que l'urée, le chlorure de calcium ou des solvants organiques.

### II.1.2. Les tannins condensés

Les tannins condensés sont encore mal connus à l'heure actuelle. Il tiennent leur nom du fait qu'ils résultent très certainement de la polymérisation de molécules de type flavone et plus spécifiquement des catéchines (Richardin et al. 1988; Jullien et Durande-Ayme 1998) impliquant la formation de molécules de grande taille. Ils ne sont pas décomposables par hydrolyse. On peut distinguer deux types distincts de flavones : les flavanol-3 ou anthocyanidines et les flavanediols-3,4 ou leucoanthocyanidines, composés de groupements cycliques flavonoïdes, comme présenté dans la figure ci-dessous (**Figure 15**).

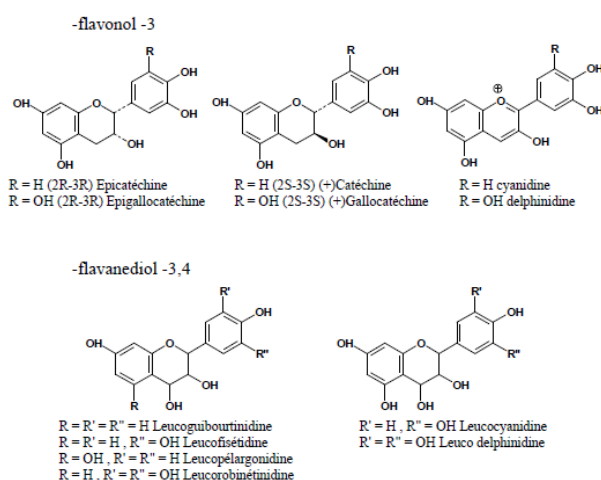


Figure 15 : Exemple de structure chimique de tannins condensés (Richardin et al. 1988).

Les tannins condensés peuvent se polymériser. Il semblerait que le mécanisme soit le suivant (**Figure 16**).

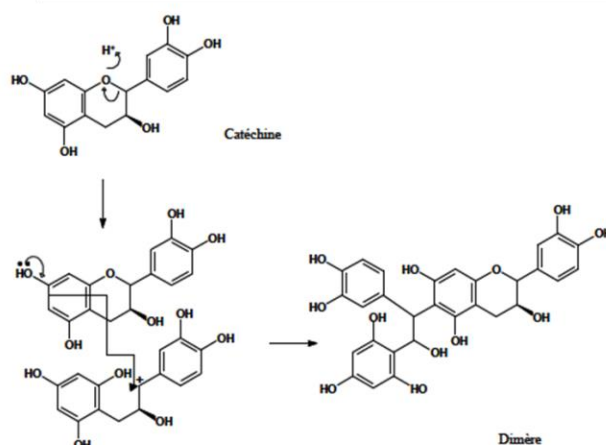


Figure 16 : Hypothèse du mécanisme de polymérisation des tannins condensés (Richardin et al. 1988).

Les tannins condensés sont moins astringents que les tannins hydrolysables car leurs groupements hydroxyles réactifs au niveau des phénols sont dispersés en raison de la plus grande taille des molécules.

Les tannins condensés interagissent avec les molécules de collagène via des liaisons hydrogène et des liaisons covalentes. La formation de ces liaisons covalentes ne permet pas de « détannage » total dans le cas de l'utilisation de tannins condensés : environ 5 à 10% des tannins restent en place au sein de la peau.

## II.2. MECANISMES DE LIAISON DES TANNINS AUX MOLECULES DE COLLAGENE

Deux mécanismes de liaison des tannins aux molécules de collagène existent. Le premier, basé sur la formation de liaisons de faible énergie, est observable pour l'ensemble des tannins végétaux. Le deuxième, observé uniquement pour les tannins condensés, repose sur la formation de liaisons covalentes.

### II.2.1. Interactions de faible énergie : interactions hydrophobes et liaisons hydrogène

Les polyphénols sont des molécules peu solubles dans l'eau. Il semblerait que le premier mécanisme d'interaction entre les tannins et les molécules de collagène soit de type hydrophobe (Siebert, Troukhanova, et Lynn 1996). Ce type d'interaction s'effectue au niveau des régions moins hydrophiles de la molécule de collagène, ce qui provoque une exclusion /expulsion de l'eau (Chahine 2013).

D'autre part, les tannins ou polyphénols possèdent une structure chimique caractérisée par la présence de groupements phénoliques hydroxylés. Ces groupements sont capables d'interagir grâce à des liaisons hydrogène avec les molécules de collagène (Shuttleworth 1952) (**Figure 17**).

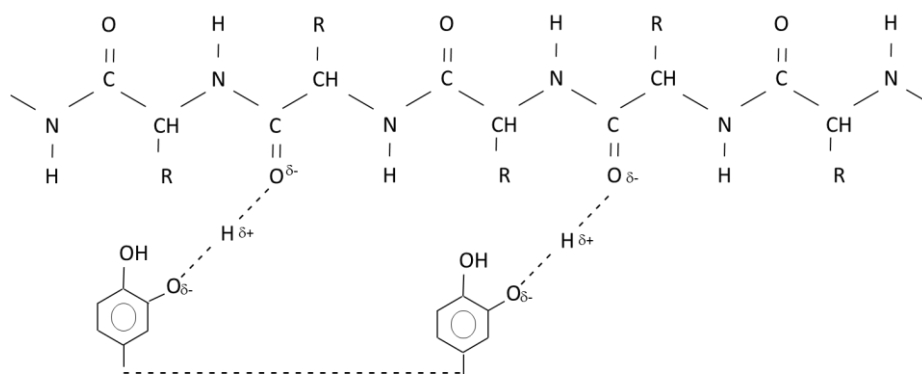


Figure 17 : Formation de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyle des polyphénols et la molécule de collagène (Covington et Covington 2009).

La formation de ces liaisons hydrogène se ferait préférentiellement au niveau des résidus prolines (Siebert, Troukhanova, et Lynn 1996) et au niveau terminal des triples hélices.

Compte tenu du très grand nombre de liaisons hydrogène, leur contribution à la formation de complexes protéines – tannins est globalement forte (Chahine 2013). Par ailleurs les tannins en interagissant avec plusieurs molécules de collagène créent des « ponts » permettant de lier les protéines entre elles (Siebert, Troukhanova, et Lynn 1996).

### III.2.2. Interactions fortes : liaisons covalentes

Le phénomène d'interaction des polyphénols et molécules de collagène par liaisons covalentes est peu décrit dans la littérature. Il semblerait que deux mécanismes de formation existent.

- Entre les groupements amines  $\text{-NH}_2$  de la protéine et les groupements quinone provenant de l'oxydation des polyphénols (en présence d'oxygène) s'ils sont de type para ou orthophénols (Gal et Carbonnell 1992; Chahine 2013), au pH usuel du tannage (pH 3,8-5), les fonctions  $\text{NH}_2$  étant protonnées (**Figure 18**).
- A la suite de la formation des nombreuses liaisons hydrogènes, les molécules de tannins vont se réticuler ensemble par l'intermédiaire de groupements pyrogallolyl.

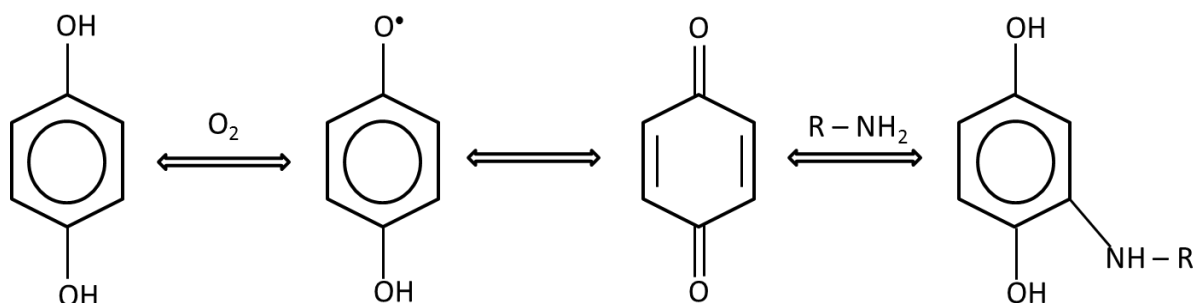


Figure 18 : Schéma réactionnel entre une quinone du tannin et une molécule de collagène (Covington 1997).

Les protéines et les tannins sont donc très fortement liés au sein des complexes. Cela entraîne des modifications importantes de propriétés des protéines du cuir et par conséquent de l'ensemble du matériau.

Dans le cas d'une molécule de collagène non tannée, les groupements hydroxy-proline sont liés à des molécules d'eau permettant une stabilisation de la structure supramoléculaire du collagène. Lors du processus de tannage, les tannins ont la capacité de s'inclure au sein de la structure, de déplacer l'eau présente afin de se lier de manière covalente aux molécules de collagène permettant un maintien des fibres entre elles et ainsi de conférer une stabilité à la molécule de collagène (Kite et Thomson 2006; Covington et Covington 2009).

Les étapes de transformation de la peau en cuir induisent l'obtention de nouvelles propriétés. Elles seront abordées dans cette troisième partie.



## C. Les propriétés d'un cuir suite à sa transformation

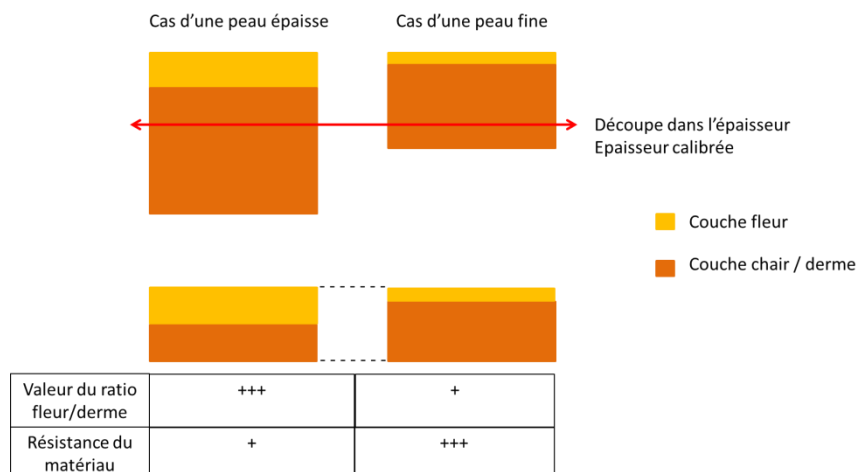
La transformation des peaux en cuir a initialement un but de protection contre la putréfaction. Alors qu'une peau non tannée est rapidement dégradée sous l'action de bactéries et d'enzymes protéolytiques, le cuir est résistant aux attaques microbiologiques même lorsqu'il est conservé mouillé. En revanche une immersion répétée des cuirs dans de l'eau entraîne une réhydratation des fibres de cuir qui permet une attaque microbiologique (Kite et Thomson 2006). Le cuir est bien moins hydraté que la peau ; le taux d'humidité au sein du cuir est proche de 10% contre 70% dans la peau. Cette diminution de l'hydratation des cuirs prévient le développement de microorganisme, en leur proposant un milieu non optimal (Covington et Covington 2009).

La transformation de la peau en cuir est également corrélée avec l'apparition de nouvelles propriétés, notamment de résistance, mécaniques et thermiques.

### I. RESISTANCE MECANIQUE

Comme discuté précédemment, les tannins interagissent avec les molécules de collagène et renforcent ce réseau par l'ajout de nombreuses interactions ayant pour conséquence d'augmenter la rigidité de la matrice et réduire la mobilité des molécules (la teneur en phase mobile du cuir est de 16% contre 29% dans le cas du collagène) (Popescu et al. 2008).


L'épaisseur de la peau et plus particulièrement le rapport fleur/chair a un impact sur les propriétés mécaniques de la peau. La résistance du cuir est donnée par la couche chair, ainsi plus le rapport sera petit, plus la peau/le cuir aura des propriétés de résistance mécanique élevées comme illustré dans la **Figure 19** ci-dessous (Covington et Covington 2009).



*Figure 19 : Schéma illustrant l'impact de l'épaisseur de la peau et du ratio fleur/derme sur les propriétés mécaniques du matériau (Covington et Covington 2009).*

Le rôle de support mécanique de la peau est endossé en majeure partie par le derme. Ces propriétés sont dues principalement aux nombreuses protéines fibreuses le constituant, essentiellement le collagène. L'arrangement et l'entrelacement des fibres de collagène au sein de la peau varient en fonction de son épaisseur mais également de son emplacement au sein de la peau. L'angle selon

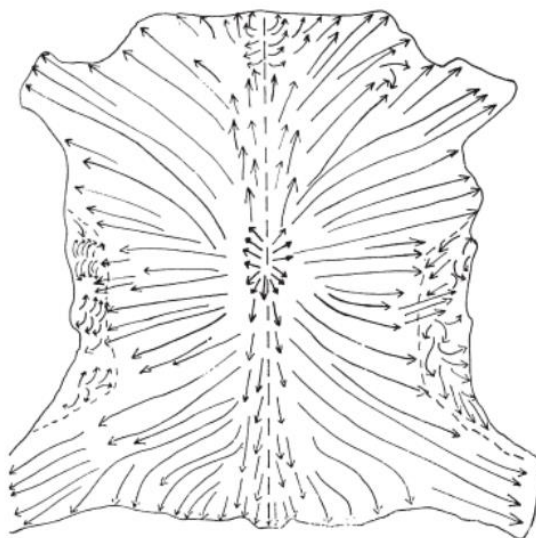
lequel les fibres sont arrangées va également conditionner les propriétés de résistance de la peau. Dans le cas où les fibres s'entrelacent selon un angle faible, un plus grand nombre de fibres peuvent s'entrelacer dépendamment de l'épaisseur du matériau lui conférant ainsi une plus grande résistance (Chahine 2013) cf **Figure 20**.



Disposition des fibres (angle)	Faible	Grand
Nombre de fibre par cm <sup>2</sup>	+++	+
Résistance à la déchirure	+++	+

*Figure 20 : Relation entre la disposition des fibres et la résistance à la déchirure du matériau (Chahine 2013).*

Selon la zone de prélèvement, les propriétés mécaniques de la peau peuvent être très différentes. Il semblerait que ce phénomène soit davantage dû à l'arrangement spatial des fibres plutôt qu'à leur hétérogénéité (Chahine 2013). La peau est considérée comme anisotrope, ses propriétés variant selon la zone considérée (**Figure 21**).



*Figure 21 : Illustration de l'anisotropie de la peau (Covington et Covington 2009).*

Afin de permettre une comparaison des peaux entre elles, une région de la peau a été identifiée comme la position officielle d'échantillonnage (OSP : Official Sampling Position) (**Figure 22**). Cette zone se situe dans le bas du dos de l'animal comme décrit dans la figure ci-dessous. De plus, afin de s'affranchir de l'anisotropie de la peau, il est recommandé d'effectuer tout test physique d'une part de façon parallèle et d'autre part perpendiculaire à la colonne vertébrale (Covington et Covington 2009).

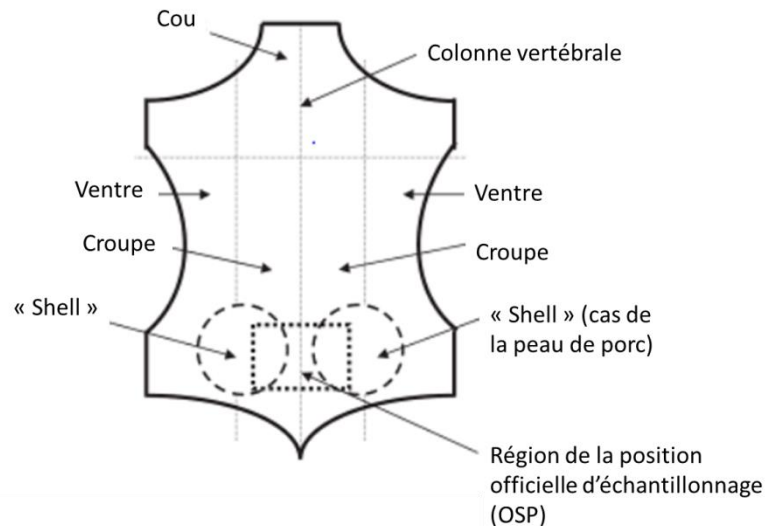


Figure 22 : Représentation de la position officielle d'échantillonnage sur le cuir (Covington et Covington 2009).

Différentes études réalisées sur l'ensemble de la surface des peaux mettent en évidence des variations au niveau des propriétés mécaniques. Les valeurs diffèrent davantage entre zones voisines d'une demie peau qu'avec la zone jumelle en miroir de l'autre demie peau (Maeser 1960; Vos et Van Vlimmeren 1973).

Il faut tout de même noter qu'outre la disposition du réseau de fibres, les propriétés mécaniques de la peau dépendent également de l'âge de l'animal. Avec l'âge, les fibres ont tendance à se réticuler provoquant une diminution de la souplesse de la peau. L'âge auquel l'animal a été abattu représente donc une donnée à prendre en compte concernant les propriétés mécaniques du cuir (Chahine 2013). Cependant d'autres facteurs entrent également en jeu tel que : le sexe de l'animal, son régime alimentaire, une éventuelle gestation, les soins reçus... de façon plus générale, son histoire, sa vie (Covington et Covington 2009).

## II. RESISTANCE A LA CHALEUR

Comme expliqué précédemment le processus de tannage a une action stabilisante sur les molécules de collagène par l'ajout de nombreuses interactions qui rendent la molécule de collagène plus résistante à la chaleur.

Lorsque la molécule de collagène est chauffée dans de l'eau, à une certaine température elle présente la caractéristique de se rétracter phénomène appelé « shrinkage » en anglais. L'apport d'énergie est tel que les liaisons hydrogène ne peuvent plus assurer le maintien de la triple hélice provoquant une libération des chaînes qui vont se contracter et adopter une consistance semblable à du caoutchouc. Cependant, grâce à la présence de liaisons covalentes ainsi que de liaisons ioniques la molécule n'est pas solubilisée (Kite et Thomson 2006).

Dans le cas d'une peau n'ayant pas subi de processus chimique tel que le tannage, la température à laquelle se produit ce phénomène appelé température de dénaturation ( $T_d$ ) est de l'ordre de 65°C. Cette température est similaire à celle observée pour le collagène natif (aux alentours de 65-70°C) (cf **Tableau 4**).

Peaux non tannées	
Peau brute de mammifère	58-64°C
Peau chaulée, pelannée de bovin	53-57°C
Parchemin	55-64°C

*Tableau 4 : Comparaison des températures de dénaturation entre peaux non tannées (Covington et Covington 2009).*

Des paramètres tels que le type de tannage, les effets du temps ou encore les phénomènes d'hydrolyse et d'oxydation ont un impact sur la température de dénaturation des fibres (Kite et Thomson 2006). Pour cette raison la température de dénaturation est mesurée pour évaluer l'état de dégradation d'un cuir.

Dans le cas d'une peau tannée, les tannins stabilisent la structure de la peau par ajout de nombreuses interactions, le cuir devient alors plus résistant à la chaleur et sa température de dénaturation est augmentée. Le tableau ci-dessous (**Tableau 5**) présente les températures de dénaturation de différentes peaux, tannées ou non tannées (Kite et Thomson 2006) (liste non exhaustive)

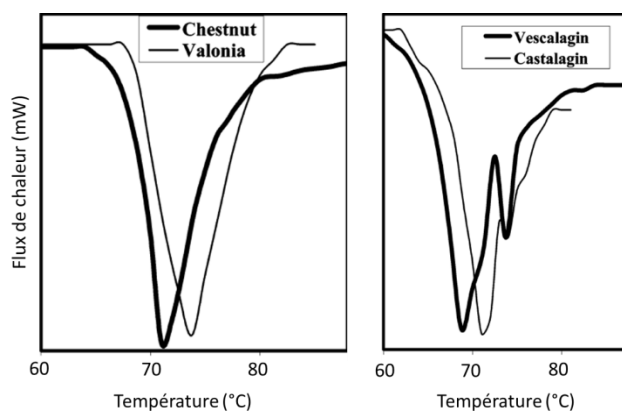
Peaux tannées	
Cuir tanné au formaldéhyde	65-70°C
Peau préparée à l'alun	70-80°C
Cuir de tannage végétal (hydrolysable)	75-80°C
Cuir de tannage végétal (condensé)	80-85°C
Cuir tanné au chrome	100-120°C

*Tableau 5 : Comparaison des températures de dénaturation entre peaux tannées. (Covington et Covington 2009).*

Comme attendu, les tannins condensés qui génèrent des liaisons covalentes avec le collagène sont plus thermo stabilisants que les tannins hydrolysables (Li et al. 2003).

La mesure de la stabilité hydrothermique peut être utilisée comme un indicateur de qualité. Plusieurs méthodes peuvent être employées pour mesurer cette valeur, parmi elles, le test à l'eau bouillante, la table chauffante (MHT pour micro hot table) et la calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour differential scanning calorimetry). La DSC permet de déterminer les températures de contraction/agrégation. Si le profil de DSC obtenu, présente un seul pic fin (cf **Figure 23** gauche) cela indique la présence d'une unique population de molécules possédant des propriétés de stabilité thermique identiques. En revanche dans le cas où plusieurs pics sont observés (cf **Figure 23** droite), cela indique que plusieurs populations de collagène possédant des propriétés de stabilité thermique

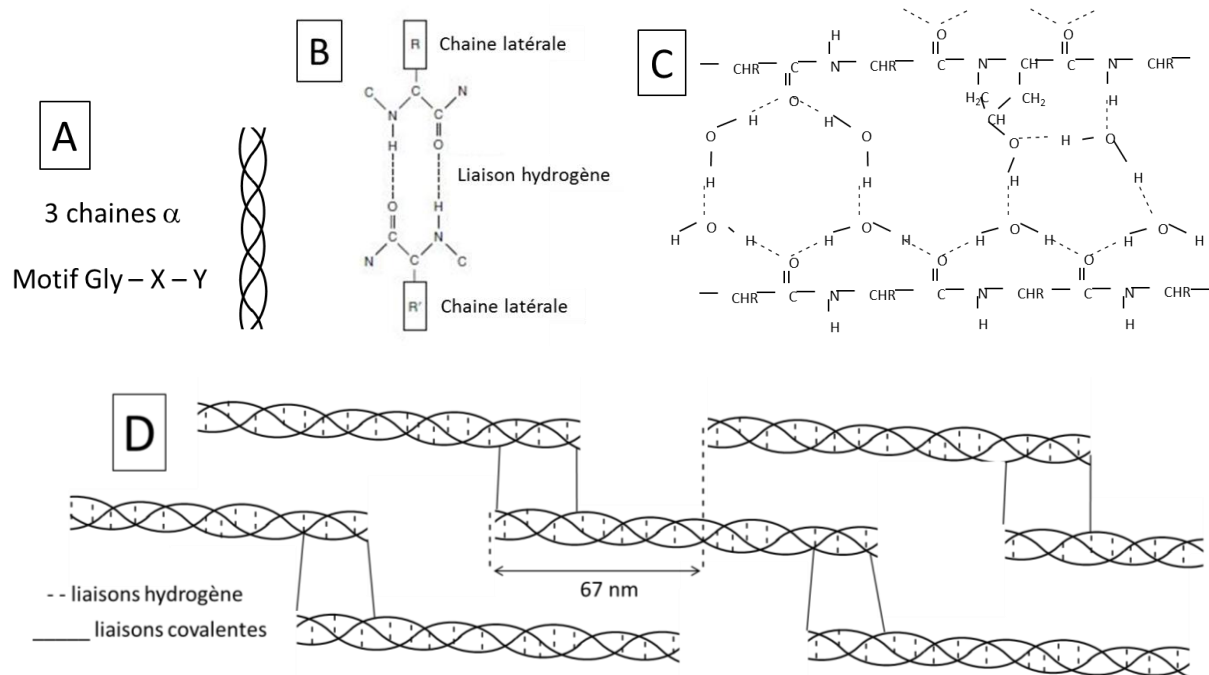
différentes sont présentes, probablement réparties dans l'épaisseur du matériau. Cela peut être le signe d'une inhomogénéité du tannage (Tang, Covington, et Hancock 2003) ou la présence de différents états de dégradation du collagène.



*Figure 23 : Profil de DSC obtenus dans le cas de différents types de tannage représentatifs d'une population de molécules possédant des propriétés thermiques identiques (gauche) ou de plusieurs populations (droite). A droite cela met en évidence un tannage non homogène (figures dans (Tang, Covington, et Hancock 2003)).*

## En résumé

Le cuir est obtenu à partir du derme d'une peau animale ; son composant majoritaire est le collagène de type I. La figure ci-dessous (**Figure 24**) propose un bilan de la partie concernant le collagène.



**Figure 24 : Structure du collagène. [A] Structure en triple hélice du (tropo)collagène. [B] Schéma de l'interaction entre groupements d'acides aminés de chaînes voisines via des liaisons hydrogène. [C] Schéma des liaisons hydrogène entre chaîne α, via l'intermédiaire des molécules d'eau. [D] Schéma du regroupement des triples hélices en fibrilles.**

Le (tropo)collagène possède une structure en triple hélice constituée de 3 chaînes α. Chacune est une séquence en acide aminé est de type glycine-X-Y où X et Y sont souvent respectivement la proline et l'hydroxyproline (**Figure 24**[A]). L'interaction entre groupements d'acides aminés de chaînes voisines via des liaisons hydrogène permet le maintien de la triple hélice (**Figure 24**[B]). Par ailleurs les molécules d'eau en formant une gaine et permettant la formation de liaisons hydrogène participent également au maintien de la triple hélice (**Figure 24**[C]). Une fois stabilisées par de nombreuses liaisons de faible énergie, les triples hélices se regroupent pour former des fibrilles puis des fibres. Les triples hélices sont pontées entre elles via des liaisons covalentes. Les molécules de collagènes sont parallèles et alignées les unes derrière les autres, espacées par un gap. La période D intermoléculaire du collagène est de 67nm (**Figure 24**[D]).

L'étape de transformation de la peau en cuir entraîne de nombreuses modifications au niveau des molécules de collagène. Les principales sont rappelées dans le schéma ci-dessous (**Figure 25**).

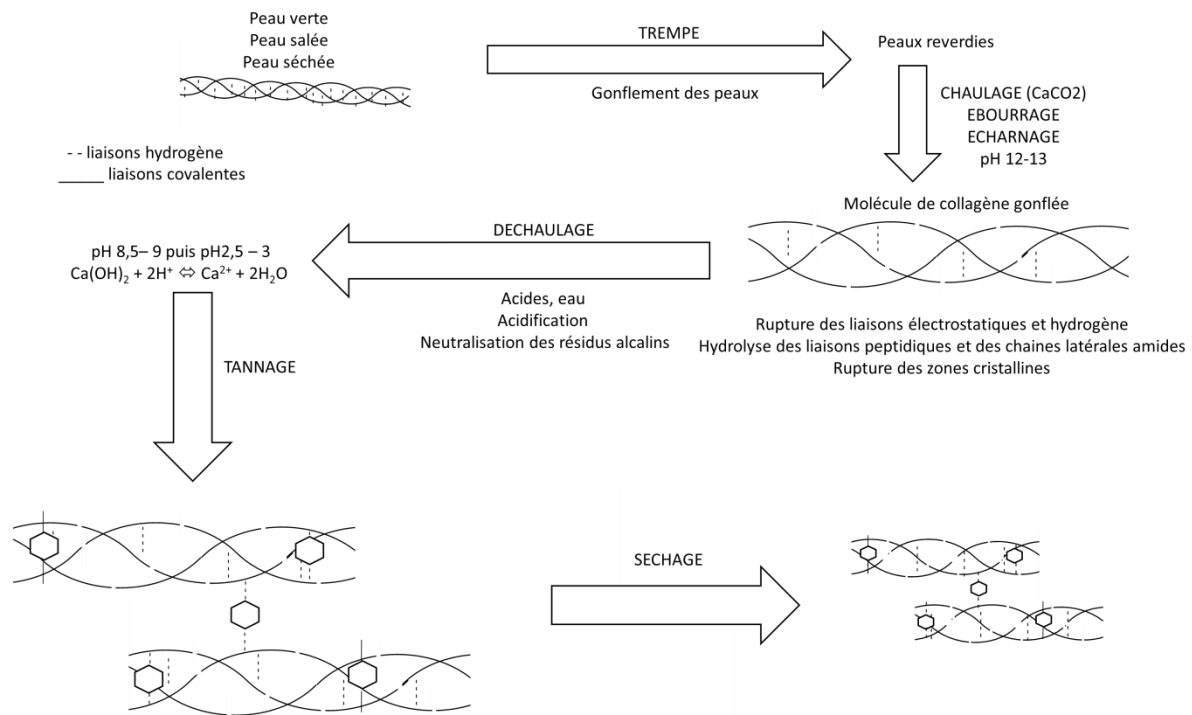


Figure 25 : Schéma bilan de l'impact du processus de transformation d'une peau en cuir au niveau de la molécule de collagène. Le schéma proposé représente les deux types de stabilisation hydrogène et covalentes des molécules de collagène par les tannins, possible dans le cas de l'utilisation de tannins de type condensés.

Le procédé de transformation permet l'acquisition de nouvelles propriétés telles qu'une résistance à la putréfaction, à la chaleur et permet l'acquisition d'une résistance mécanique.

Le cuir peut cependant être altéré par les effets du temps ou par l'intervention de nombreux facteurs extérieurs. Dans une seconde partie, nous proposons d'étudier les différentes altérations, leurs mécanismes et quelques méthodes seront proposées pour caractériser le degré d'altération.

## **PARTIE 2 : ALTERATIONS, CARACTERISATION DU DEGRE DE DETERIORATION**

Comme décrit précédemment la transformation de la peau en cuir permet d'obtenir un matériau résistant aux actions mécaniques, à la chaleur et aux microorganismes. Les propriétés de résistance des cuirs leur ont permis de traverser les siècles et une partie d'entre eux constituent notre patrimoine dont il est nécessaire d'assurer la conservation. Dans cette deuxième partie seront présentées les altérations des cuirs, ainsi que les techniques d'analyses développées et couramment utilisées sur un cuir pour déterminer son degré de détérioration.

### **A. L'altération des cuirs**

#### **I. LES FACTEURS D'ALTERATION**

Le principal facteur d'altération dans le cas des cuirs et plus largement des objets en cuir de type ouvrages, repose sur les manipulations répétées des matériaux. Cette cause s'ajoute aux nombreuses autres, dues à l'environnement dans lequel se trouve le matériau.

Les cuirs sont particulièrement sensibles aux variations de température et d'humidité relative. De manière générale, la peau est un matériau très hygroscopique. Grâce à la présence de nombreux groupements polaires, une peau non tannée est capable d'absorber jusqu'à 30% de son poids en eau lorsqu'elle est placée dans des conditions de forte humidité relative. Suite au tannage, les groupements polaires sont engagés au sein des complexes protéines-tannins provoquant une diminution des capacités d'absorption d'eau à partir de l'air (Chahine 2013). Cependant, leur capacité à absorber et évaporer l'humidité de l'atmosphère lorsque celle-ci varie n'est pas nulle. Les cuirs restent des matériaux hygroscopiques ainsi une diminution de l'aire de l'échantillon de cuir peut être observée suite à une diminution de l'humidité relative (Thomson 2006b).

Il peut être souligné que l'absorption d'eau par les protéines est un phénomène exothermique, de ce fait, en s'hydratant, la température du cuir peut augmenter ce qui dans le cas d'un cuir dégradé le rend plus vulnérable encore (Chahine 2013).

Lorsque le cuir absorbe l'humidité, les molécules présentes de type « non tannins » au sein de la structure fibreuse sont dissoutes. Dans le cas d'une forte diminution de l'humidité relative, l'eau emprisonnée au sein du cuir va s'évaporer depuis le cœur du matériau vers l'extérieur entraînant dans son mouvement vers la surface des molécules non tannantes qui vont s'accumuler à la surface. Les molécules constitutives du cuir sont alors concentrées, notamment au niveau de la surface ce qui est corrélé avec une augmentation de l'adhésion des fibres et fibrilles ayant pour conséquence de réduire la flexibilité du matériau (Thomson 2006b; Kite et Thomson 2006). Cf **Figure 26**.



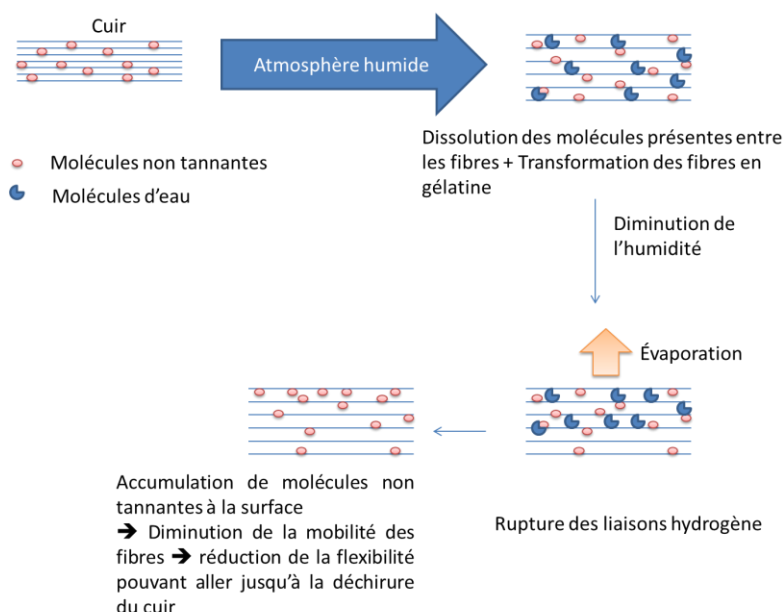


Figure 26 : Effet des variations d'humidité relative sur les molécules non tannantes (Thomson 2006b).

Une perte brutale d'eau peut conduire à une fragmentation et à des déchirures du cuir. D'autre part, le cuir tanné végétalement peut également se colorer, se durcir et des fissures peuvent apparaître en surface. La déshydratation peut également induire une perte de flexibilité (Thomson 2006b).

La présence d'humidité (humidité relative de l'ordre de 70 à 100%) accompagnée de températures supérieures à 22°C favorise la croissance de microorganismes de types bactéries ou fungi (Wess, s. d.). Les fungi, représentent la première cause de bio-détérioration des cuirs. Ils sont capables de croître et de s'attaquer aux produits dérivés de la peau. Les genres les plus souvent rencontrés sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Paecilomyces*. Une présence trop importante de moisissures peut endommager la surface du support, entraînant une perte de résistance à la traction, une capacité d'étirement diminuée et un affaiblissement des fibres. Un abaissement de l'humidité atmosphérique à un taux inférieur à 65% d'humidité permet d'empêcher leur développement. Les cuirs sont peu sensibles à l'action des enzymes protéolytiques sécrétées par les insectes. En revanche, les lépismes (poisson d'argent) et psoques (poux des livres) sont capables de « brouter » les couches de pâtes lavantes souvent appliquées lors des finitions. D'autre part, les teignes de vêtements (ou mites) peuvent manger le cuir (Thomson 2006b). Des petits rongeurs tels que des rats peuvent également endommager les ouvrages.

Par ailleurs, la lumière et plus particulièrement les U.V ainsi que les polluants atmosphériques tels que le dioxyde de soufre peuvent générer des radicaux libres à l'origine d'altérations de type oxydation.

Au vu de l'ensemble de ces remarques, les conditions idéales de conservation sont les suivantes : la température est de 18°C et ne doit jamais excéder 25°C, le taux d'humidité relative est de 50-60%. Les ouvrages sont protégés de la lumière ou à défaut des rayonnement U.V (par exemple en équipant les fenêtres de filtres adéquats (van Soest, Stambolov, et Hallebeek 1984).

Nous proposons de décrire les mécanismes d'altération dans la partie suivante.

## II. LES MECANISMES D'ALTERATION.

Les mécanismes chimiques de dégradation de la peau et plus particulièrement de la molécule de collagène seraient principalement dus à deux types de réactions : oxydation et hydrolyse (Della Gatta et al. 2005). Ces deux phénomènes mènent à une dénaturation irréversible de la triple hélice de collagène (Badea, Gatta, et Budrugaac 2011) et sont accentués en condition de chaleur humide pour l'hydrolyse et en chaleur sèche pour l'oxydation (Chahine 2013). Dans cette partie, l'altération de type gélatinisation (au sens physico-chimique) sera également abordée.

### II.1. MECANISME DE L'HYDROLYSE ACIDE

L'hydrolyse acide, caractérisée par un clivage de la molécule de collagène en petits fragments, représente une cause majeure de détérioration. Elle est favorisée en présence d'une forte humidité relative, de polluants atmosphériques et de composants acides.

A l'origine de ce phénomène, la présence de polluants atmosphériques « acides » tels que le dioxyde de soufre ( $\text{SO}_2$ ). Ce polluant est absorbé par le cuir et est transformé en trioxyde de soufre ( $\text{SO}_3$ ) sous l'action de la lumière du soleil, la molécule interagit avec les tannins. L'humidité présente au sein du cuir provoque la transformation de ces molécules en acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), qui va libérer des ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  capables de rompre les liaisons peptidiques entre les acides aminés de la chaîne de collagène. La molécule de collagène perd alors sa structure hélicoïdale et est clivée en fragments de petite taille (Kennedy et Wess 2003; Florian 2006). Le mécanisme est décrit ci-dessous en **Figure 27**.

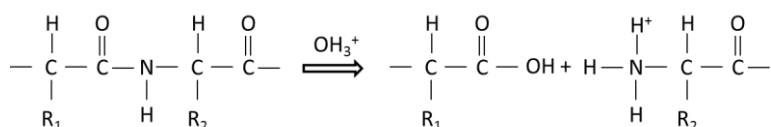


Figure 27 : Mécanisme d'hydrolyse acide.

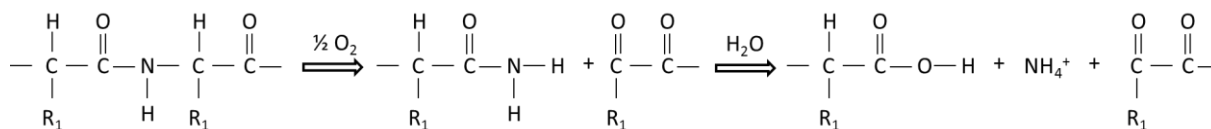
Les fragments ainsi obtenus pourraient se combiner avec l'eau aboutissant à la production de gélatine dans les cas où la molécule de collagène a perdu sa structure (Gatta et al. 2005; Florian 2006). A un stade très avancé, cette altération est connue sous le nom de pourriture rouge, ou « red rot » en anglais, et touche les cuirs de tannage végétal, principalement avec des tannins condensés, générant un matériau très friable, de couleur rouge et émettant une odeur âcre (Thomson 2006a).

Etant favorisée dans un environnement pollué, l'hydrolyse est plus importante en ville qu'en zone rurale où l'atmosphère est saine et où l'oxydation représente la cause majeure de détérioration (Thomson 2006b).

### II.2. OXYDATION DE LA MOLECULE DE COLLAGENE

L'oxydation des cuirs est causée par des radicaux libres générés par le chauffage, la lumière UV, le dioxyde de soufre ( $\text{SO}_2$ ), l'ozone et les peroxydes (Gatta et al. 2005, Florian 2006). L'oxydation

provoque une rupture des liaisons covalentes de types N-C entre le groupement aminé et le groupement carboxylique de l'acide aminé (Kennedy et Wess 2003; Della Gatta et al. 2005) et serait par conséquent à la base d'une dégradation des chaînes peptidiques du collagène entraînant une transformation de la protéine (**Figure 28**). Dans ce cas, la rupture a lieu en aval de l'amine



*Figure 28 : Mécanisme de clivage de la chaîne polypeptidique par oxydation (Kennedy et Wess 2003b; Bowes et Raistrick 1967).*

La détermination de la répartition du rapport acides aminés acides/basiques révèle que le taux d'acides aminés basiques tels que la lysine, l'hydroxy-lysine, et l'arginine diminue au profit d'une augmentation du nombre d'acides aminés acides tels que l'acide aspartique et glutamique (Kennedy et Wess 2003; Thomson 2006b). Dans le cas du collagène natif, le ratio acide aminé (Basique/Acide) observé dans le cas du collagène natif (0,69) est supérieur à celui rencontré pour un cuir historique de tannage végétal pour lequel le ratio peut atteindre 0,46 (Chahine 2013).

Il a été montré que la réaction d'oxydation dépendait de la nature du tannin utilisé, du taux d'humidité relative contenu dans l'air et qu'elle était accélérée par la lumière (« Traduction de "La sauvegarde des fonds de livres". Bibliothèque Nationale de Lénine. Recueil des travaux scientifiques » 1978). Pour illustration les rayons UV (100-400nm) peuvent être cités car ils ont la capacité de fragmenter la molécule d'eau en deux radicaux libres  $\text{H}^*/\text{OH}^*$  (Kennedy et Wess 2003).

L'oxydation peut aussi avoir lieu dans des conditions de chaleur sèche (Chahine 2013) et elle provoque une diminution de la stabilité hydrothermique. La température de contraction peut être abaissée jusqu'à 20°C dans le cas de collagène oxydé alors qu'elle est de l'ordre de 65°C dans le cas d'une molécule native (Florian 2006).

Bien que les phénomènes d'oxydation et d'hydrolyse mènent à une scission de la molécule de collagène, les mécanismes ne sont pas identiques. Dans le cas de l'hydrolyse la liaison peptidique est rompue alors que dans le cas de l'oxydation, la rupture a lieu en aval de l'amine.

### II.3. GÉLATINISATION

Le terme « gélatinisation » sera considéré dans sa définition physico-chimique et fera référence à une fonte des zones cristallines du cuir. Le cuir étant composé majoritairement de collagène, ce terme ne doit pas être confondu avec le phénomène de transformation en gélatine, observable en présence d'eau et qui fait référence à une dénaturation du collagène caractérisée par une dissociation de la triple hélice.

Comme abordé précédemment, le cuir est un matériau composé majoritairement de protéines collagéniques, lui conférant une structure semi-cristalline.

En milieu peu hydraté, les substances amorphes et cristallines sont très sensibles aux effets des plastifiants c'est-à-dire de l'eau dans le cas de milieux biologiques. Lorsque le matériau est chauffé ou refroidi, des changements de types fusion, cristallisation ou encore transition vitreuse ont lieu au

sein du matériau. La température de transition vitreuse ( $T_g$ ) est une caractéristique importante de toutes substances amorphes ou semi cristallines telles que le collagène.

Lorsque la  $T_g$  est atteinte, le système évolue vers un état caoutchoutique ou de liquide sous-refroidi. Passé cette température, le matériau est dit gélatinisé et présente un aspect fondu. La gélatinisation d'un matériau ne concerne pas uniquement ceux à base de collagène, ainsi l'amidon qui est un polysaccharide peut être dit gélatinisé.

La  $T_g$  est induite par augmentation de la température ou par ajout d'un plastifiant (l'eau par exemple) ainsi la température de transition vitreuse est dépendante de l'hydratation du matériau. Par exemple dans le cas de l'élastine, la  $T_g$  a lieu à 50°C lorsque le taux d'hydratation du matériau est de 15%. La diminution du taux d'hydratation à 5% induit une augmentation de la température de transition vitreuse à environ 140°C (cf **Figure 29**) (Blond et Le Meste 1988; Le Meste et Colas 1990).

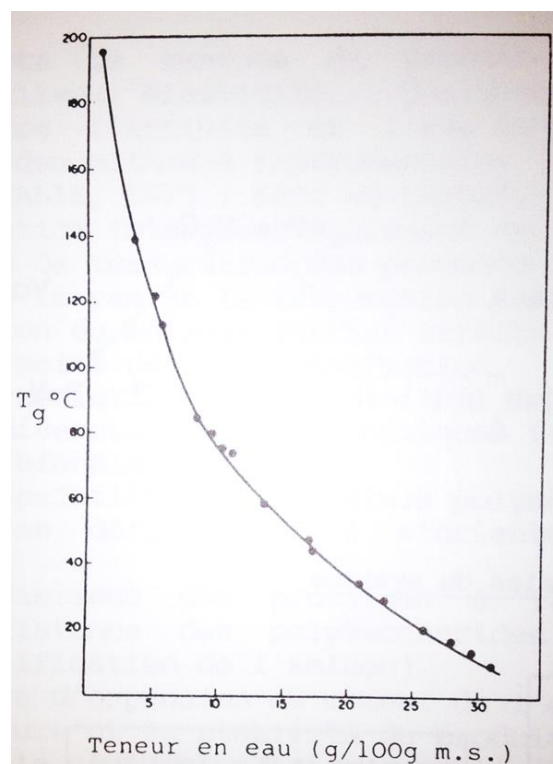


Figure 29: Corrélation entre taux d'hydratation de l'élastine et la température de transition vitreuse.

Afin d'identifier les mécanismes de détérioration impliqués et déterminer le degré d'altération, différentes techniques d'analyse peuvent être utilisées. Une liste non exhaustive sera proposée dans la prochaine partie.

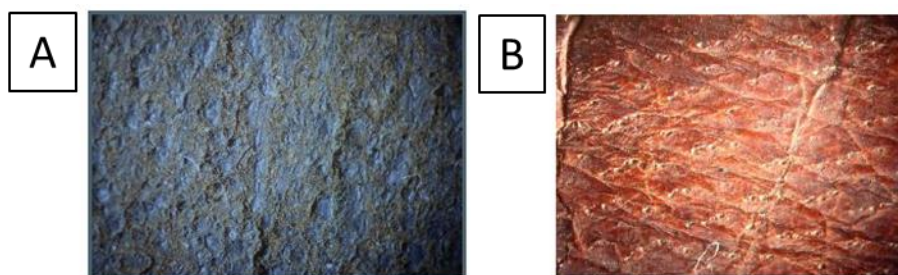
## B. Méthodes de caractérisation du degré d'altération des cuirs

La détermination du degré de détérioration peut être réalisée grâce à différentes techniques qui peuvent être visuelles, thermiques, chimiques ou encore mécaniques.

### I. OBSERVATIONS VISUELLES

L'observation microscopique voire macroscopique d'un cuir peut permettre d'accéder à des informations sur son état de détérioration. L'observation visuelle est réalisée sur la surface du matériau ou sur des fibres. En surface, on regardera la couleur, l'abrasion, la délamination, la déformation ; sur les fibres, leur cohésion, leur longueur...

Les fissures, déformation, aspect cranté des bords, fragilité sont à prendre en compte, de même que les dommages perceptibles causés par l'humidité, résidus minéral, et les moisissures (Plavan et al. 2013). Les variations de couleurs, d'odeurs renseignent sur des phénomènes complexes comme la pourriture rouge. La variation de taille (rétraction ou allongement) est à mesurer et renseigne sur la flexibilité du cuir et ses relations à l'eau. A une échelle macroscopique, un matériau friable rend compte d'une détérioration avancée du matériau. La **Figure 30** propose une observation par microscopie optique de la surface de deux cuirs altérés. La **Figure 31** propose une comparaison de la surface de deux échantillons de cuir, un neuf, l'autre historique par microscopie électronique à balayage.



*Figure 30 : Cuirs historiques à différents degrés de détérioration. [A] cuir de veau/bovin extrêmement détérioré. Les pores ne sont quasiment plus discernables. [B] cuir de mouton présentant des déchirures et craquelures (Bernath, Miu, et Guttman 2008)*

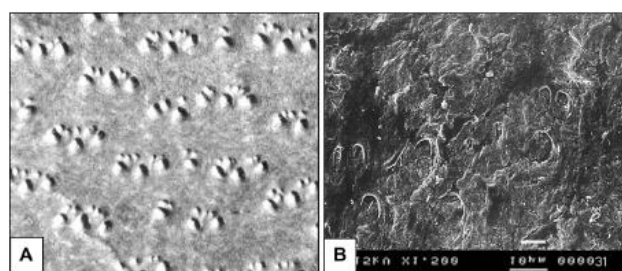


Fig. 7. Identification of animal skin: (A) goat skin (after Haines, 1981), (B) goat skin from the historical bookbinding.

*Figure 31 : Observations au MEB d'un cuir de chèvre de tannage végétal récent d'après Haines 1981 et l'observation au MEB d'un cuir historique du 19eme siècle (Abdel-Maksoud 2011)*

## II. ANALYSES THERMIQUES

### II.1. DETERMINATION DE LA TEMPERATURE DE DENATURATION – STABILITE HYDROTHERMIQUE

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC – Differential Scanning Calorimetry) sur échantillons saturés en eau et la table chauffante (MHT - Micro Hot Table) sont deux méthodes permettant d'obtenir des informations sur les températures de dénaturation ; il a été montré que les valeurs obtenues par ces deux méthodes ne varient que de quelques degrés (Budrugaec, Cucos, et Miu 2011). Il faut noter que le phénomène de dénaturation observé par MHT et en DSC dans le cas d'échantillons mouillés est un processus endothermique, c'est-à-dire que ce processus nécessite une absorption d'énergie/chaleur par l'échantillon.

La température de dénaturation permet de déterminer le degré de détérioration d'un cuir historique (Thomson 2006a).

Dans le cas d'un cuir historique, donc détérioré, la contraction des fibres de cuir se produit à des températures inférieures à celles observées dans le cas d'un cuir neuf (Budrugaec et Miu 2008) (**Figure 32**). Dans la suite du texte, un cuir neuf sera défini comme un cuir de fabrication récente.

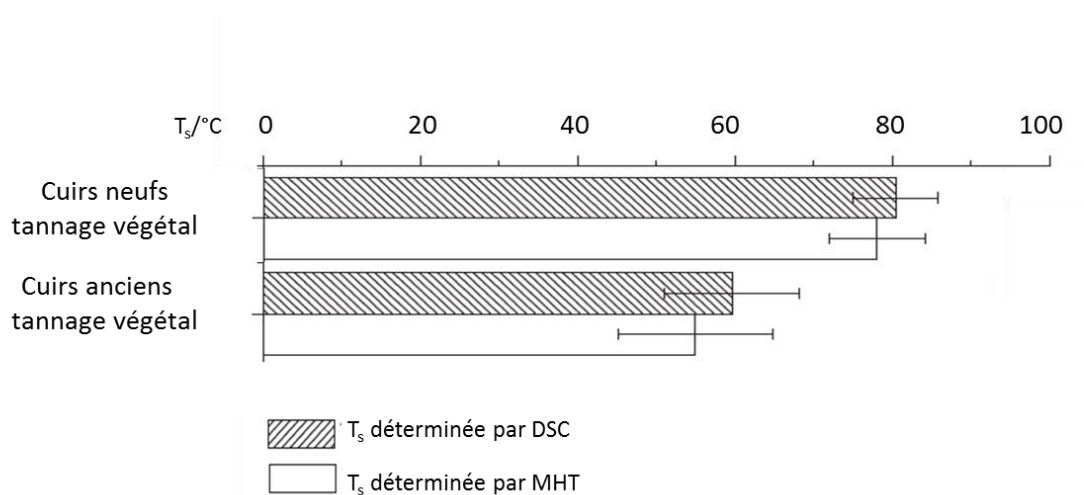


Figure 32 : Moyenne des valeurs de températures de dénaturation ( $T_d$ ) obtenues dans le cas de cuirs neufs et anciens (XVe-XIXe siècles) de tannage végétal (Budrugaec et Miu 2008).

Les résultats obtenus sont en accord avec l'hypothèse d'une rupture des liaisons covalentes du matériau lors des premières étapes de la dégradation naturelle des cuirs (Budrugaec et Miu 2008).

## II.2. DETERMINATION DES TEMPERATURES DE TRANSITION DE PHASE ET IMPACT SUR LES ZONES CRISTALLINES

L'analyse par DSC en condition sèche permet d'obtenir des informations sur les températures de transition de phases.

Un cuir de tannage végétal non dégradé renferme environ 15% d'humidité lorsqu'il est placé dans une atmosphère à 65% d'humidité relative. Alors que dans des conditions où le cuir est saturé en eau, la température de contraction observée est proche de 80°C, en absence d'eau additionnelle, l'échantillon peut résister à des températures bien supérieures à 100°C avant de se contracter (Thomson 2006a).

En **Figure 33** sont présentés les profils pouvant être obtenus dans le cas de cuirs neufs et historiques.

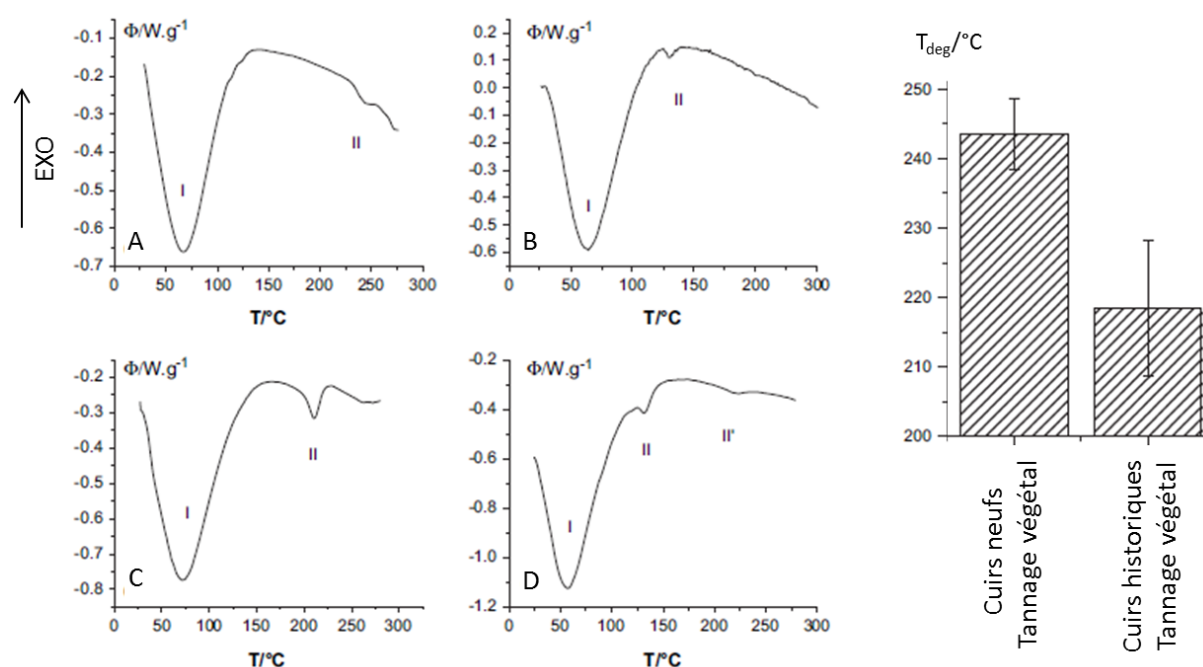


Figure 33 : Analyse en DSC de (A) cuir neuf de tannage végétal, (B-D) cuirs historiques de tannage végétal du 18<sup>e</sup> siècle (Budrueac et Miu 2008). Histogramme : comparaison des températures de dégradation ( $T_{deg}$ ) entre cuirs de tannage végétal neufs et historiques.

Le premier pic observé (I) en DSC est attribuable à la déshydratation de l'échantillon, le deuxième pic (II) n'est pas corrélé à une perte de masse (vérifié par analyse thermogravimétrique (TGA – thermogravimetric analysis, non montrée), mais indique la présence d'un phénomène de dégradation notamment de la structure cristalline du collagène. Ce phénomène se produit à des températures différentes selon l'échantillon de cuir étudié. Les histogrammes correspondants à la température de dégradation (fusion des zones cristallines) révèlent une température inférieure dans le cas des cuirs historiques. Ce phénomène peut être attribué à une diminution du degré de réticulation due au vieillissement naturel des cuirs qui conduit à la fragmentation de la matrice cristalline. La quantité de phase cristalline est toujours élevée mais moins qu'au sein d'un cuir neuf

(récemment manufacturé). La présence de deux pics distincts de fusion des zones cristallines observées dans le cas de certains cuirs historiques est le signe d'une hétérogénéité du matériau, attribuable à la fragmentation de la matrice réticulée. Ceci peut être dû aux méthodes de préparation des cuirs mais également à leurs conditions de conservation (Budrugaec et Miu 2008 ; Popescu et al. 2008).

### III. ANALYSES CHIMIQUES : FTIR, PH, HPLC

#### III.1. IMPACT DU VIEILLISSEMENT SUR L'ACIDIFICATION DES CUIRS

L'acidification des cuirs est un marqueur de leur détérioration. Comme abordé précédemment, l'acide sulfurique présent dans le cuir est à l'origine des phénomènes d'hydrolyse.

La mesure du pH d'un cuir est réalisée par immersion d'une pièce de cuir dans de l'eau et doit impérativement respecter un certain rapport cuir/solution. Elle permet d'évaluer la quantité d'acides présente au sein du cuir et de déterminer si l'acidité est dommageable pour le cuir et cause d'une détérioration (Larsen 1991-1994; Thomson 2006a). Cette technique est couramment utilisée par la BnF dans le cadre de la sélection d'un cuir de tannage végétal destiné à la restauration de livres anciens (Barbe et al. 2006).

Il faut cependant nuancer ces valeurs et ne pas se contenter de la mesure du pH de l'extrait aqueux pour déterminer si un cuir est détérioré. En effet, en 1937, Atkin et Thompson, révélaient qu'une oxydation couplée à une acidification, pouvaient être à l'origine d'une libération d'ammoniac qui en se combinant avec des acides forts (acide sulfurique) présents au sein du cuir aboutit à la formation de sulfate d'ammonium qui augmente le pH (Thomson 2006a).

#### III.2. DETERMINATION DU RATIO ACIDE AMINES ACIDES/BASIQUES

La technique de l'HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) permet de déterminer le rapport entre acides aminés acides et basiques.

Comme énoncé précédemment, la détérioration du cuir est consécutive à l'hydrolyse et/ou l'oxydation des collagènes et des tannins. Dans le cas de collagène non détérioré le taux d'acides aminés acides et basiques est équivalent. La dégradation oxydative du collagène provoque une transformation des acides aminés basiques en acides aminés acides (Plavan et al. 2013). Dans le cas d'une détérioration par oxydation uniquement, la teneur en acides aminés acides doit augmenter de la même valeur.

La technique de l'HPLC, par détermination du taux de chacun des acides aminés ainsi que le calcul du rapport acides aminés acides/basiques permet de déterminer le degré de détérioration d'un cuir (Larsen – Projet européen STEP LEATHER PROJECT « protection and Conservation of European Cultural Heritage », (1991-1994)). La **Figure 34**, présente la répartition des acides aminés dans le cas d'un cuir neuf et d'un cuir ancien.



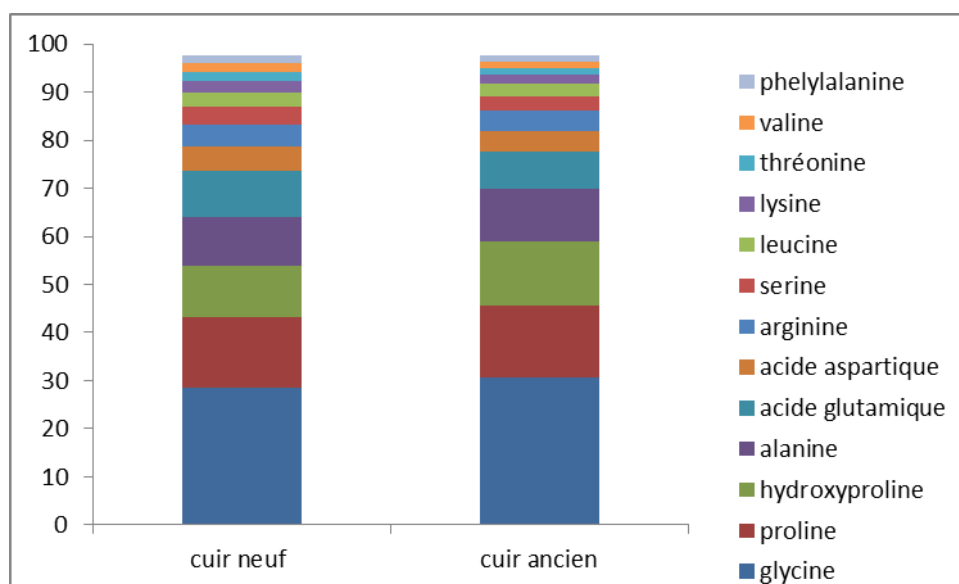


Figure 34 : Détermination du taux d'acides aminés par HPLC , après hydrolyse, de cuirs neufs et d'un cuir ancien (XV-XVIe siècles) (V. Plavan et al. 2013).

Dans l'exemple illustré ci-dessus, les taux d'arginine et lysine sont de 7,11 % dans le cas du cuir neuf et de 6,18% pour l'ancien. Cependant, au lieu d'augmenter, le taux d'acides aminés acides diminue de 1,66% dans le cas du cuir ancien signe que la détérioration est due à la fois à un phénomène d'oxydation et d'hydrolyse.

### III.3. DETERMINATION DES FACTEURS DE DETERIORATION

L'analyse par infrarouge à transformée de Fourier en mode ATR permet d'obtenir des informations sur le degré de détérioration ainsi que les causes : hydrolyse, gélatinisation, oxydation.

L'analyse du spectre brut et plus particulièrement de la position des bandes amides I et II vont renseigner sur les phénomènes d'hydrolyse et gélatinisation. Ainsi, l'écart entre la position de la bande amide I et amide II ( $\Delta\nu$ ) fait référence au phénomène de gélatinisation. Un écart de  $100\text{cm}^{-1}$  est observé dans le cas d'un matériau non endommagé. Cet écart augmente en cas d'une gélatinisation. Le rapport amide I/amide II ( $A_I/A_{II}$ ) fait référence au degré d'hydrolyse, dans le cas d'un matériau non endommagé une valeur proche de 1 est attendue. Le phénomène d'oxydation quant à lui est révélé par la présence d'un pic aux alentours de  $1740\text{cm}^{-1}$  (groupement carbonyles) (Plavan et al. 2010; Carçote et al. 2014 ). La **Figure 35** présente les profils obtenus dans le cas de l'analyse ATR de parchemin et cuir de tannage végétal.

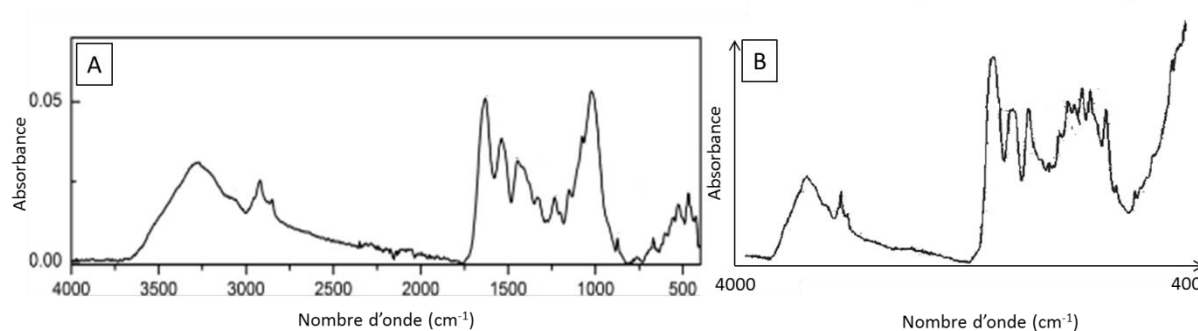


Figure 35 : Profil infrarouge ATR obtenu dans le cas d'un parchemin de manuscrit byzantin (IX-Xe siècle) [A] (Carçote et al. 2014) ou d'un cuir de veau tanné au quebracho (tannins condensés) [B](Plavan et al. 2010). Les signaux sont globalement similaires.

#### IV. TESTS MECANIQUES

Afin de mesurer les propriétés mécaniques, des tests de résistance à la traction et d'allongement à la rupture, réalisés selon la norme AFNOR G52-002, ainsi que des tests de résistance au déchirement (AFNOR G52-014), peuvent être entrepris. Plus récemment de nouvelles techniques moins destructives ont été développées : la DMA (analyse mécanique dynamique) ou la DTMA (analyse thermique mécanique dynamique) permettent d'obtenir des informations sur les propriétés mécaniques des cuirs et sur l'effet du vieillissement naturel des cuirs sur leurs propriétés mécaniques.

##### IV.1. MODE EN TENSION

L'analyse en mode tension, d'échantillons de cuirs, permet d'obtenir des informations sur les valeurs de  $\tan \delta$ , également appelé facteur de perte. Il correspond à la transition entre état vitreux et caoutchouteux d'un polymère. Les valeurs de module de conservations  $E'$  corrélées à la rigidité de l'échantillon sont aussi mesurées par la DMA.

Le vieillissement du cuir induit une diminution de la température de  $\tan \delta$  et l'intensité du pic est inférieure pour le cuir ancien traduisant une diminution de la viscoélasticité par rapport au cuir neuf (cf **Figure 36**) (Odlyha et al. 2000).

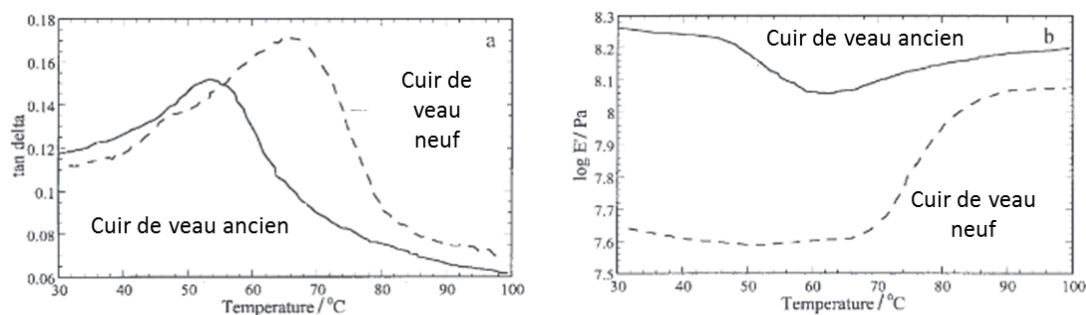


Figure 36 : Courbes représentant les valeurs de  $\tan \delta$  (a) et valeurs de module de conservation  $E'$  (b) dans le cas de cuirs de chèvre de tannage au sumac neuf ou vieilli artificiellement (équivalent 10 ans) (Odlyha et al. 2000).

La valeur de module de conservation  $E'$  relevée à température ambiante est supérieure dans le cas du cuir ancien, indiquant que le cuir ancien est plus rigide que le cuir neuf. Lorsque les échantillons sont chauffés jusqu'à leur température de contraction, l'échantillon de cuir neuf voit ses valeurs de module de conservation largement augmentées alors que pour le cuir ancien ces valeurs augmentent peu. Le cuir neuf devient rigide de manière significative cf **Figure 36(b)**. L'augmentation de la rigidité est sans doute due à la perte d'hydratation plus importante dans le cas de l'échantillon neuf qu'ancien (Odlyha et al. 2000).

#### IV.2. BALAYAGE DE TEMPERATURE

L'analyse des propriétés mécaniques d'un cuir au cours de son exposition à la chaleur permet d'obtenir des informations sur les changements de structure, se produisant avec la chaleur et leurs conséquences sur les propriétés mécaniques. Cucos *et al.* utilisent la DMA en balayage de température afin de caractériser des échantillons historiques. Les profils obtenus dans le cas d'un cuir neuf et d'un cuir historique diffèrent comme présenté dans la **Figure 37**.

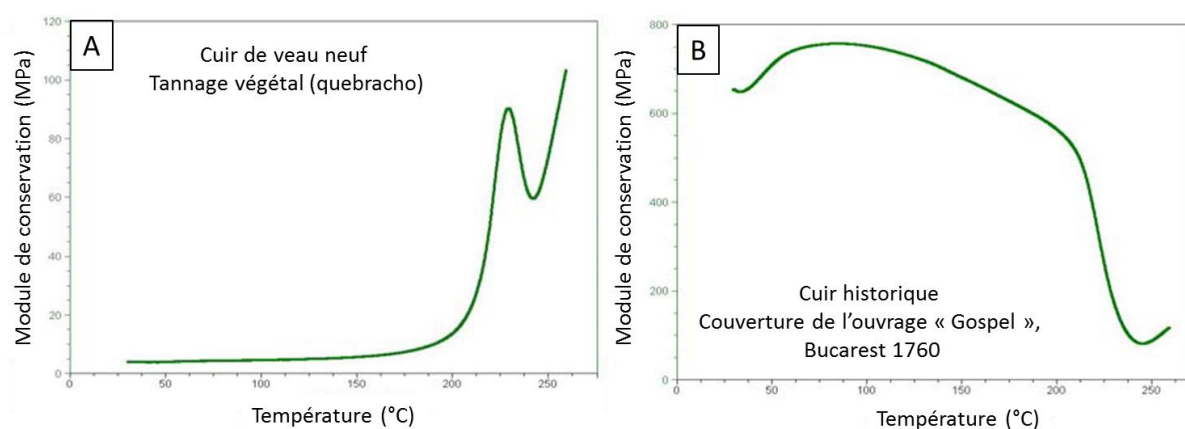


Figure 37 : Profil de DMA obtenu par balayage de température sur un échantillon neuf et un échantillon historique (Cucos et Budrugaac 2010).

Selon les auteurs, l'augmentation des valeurs de module de conservation avec la température pour le cuir neuf est attribuable à la formation de nouvelles réticulations au niveau des molécules de collagène due à la présence de tannins en excès. La diminution des valeurs de modules observée est quant à elle attribuable à la fonte des fractions cristallines (rigides) du cuir. On peut noter que la température relevée ici ( $> 230^{\circ}\text{C}$ ) est similaire à celle observée en DSC correspondant au même phénomène. Une fois, les fractions cristallines fondues, le renforcement du matériau continue.

Dans le cas de l'échantillon de cuir historique, la courbe obtenue présente un profil très différent. Les valeurs de module de conservation relevées à température ambiante sont très supérieures à celles observées dans le cas de l'échantillon de cuir brut indiquant que le cuir historique est beaucoup plus rigide que le cuir neuf. Ce profil met aussi en avant un processus de fusion des zones cristallines beaucoup plus marqué (large) que le phénomène de création de liaisons covalentes. Selon les auteurs, au sein d'un cuir ancien les régions cristallines des molécules de collagène sont fragmentées et le matériau devient hétérogène (d'où la présence d'un pic très large de fusion) (Cucos et Budrugaac 2010; Cucos et al. 2011).

## En résumé

Les altérations des cuirs sont la conséquence de mauvaises conditions de conservation ou la conséquence de manipulations répétées. Un certain nombre de facteurs d'altération existe, les plus fréquents sont les suivants :

- sollicitation mécanique
- microorganismes/rongeurs
- variations de température et d'humidité relative
- la lumière, les U.V.
- les polluants.

De nombreuses études proposent des méthodes pour la détermination du degré d'altération. Elles peuvent donner des informations tant visuelles, repérables à l'œil nu qu'à différentes échelles de structure du matériau. Pour une meilleure détermination, elles peuvent être combinées.

Les altérations présentées précédemment sont classiques et couramment rencontrées dans le cas de cuirs anciens et historiques. Afin de pallier les problèmes de conservation, différentes stratégies sont mises en place. Elles consistent notamment à conditionner les matériaux dans des rangements appropriés et dans des lieux aux conditions thermo-hygrométriques et lumineuses contrôlées. Cependant les altérations peuvent également être induites par la technique de fabrication, les matériaux/environnement interagissant avec le cuir, les traitements appliqués ou encore lors d'accidents, tels que les incendies. Très rares, ces derniers sont à l'origine de la dégradation voire de la destruction d'un grand nombre de pièces en cuir.

Dans une troisième partie, nous proposons d'étudier plus en détail les effets de la chaleur sur les cuirs.

### **PARTIE 3 : LES EFFETS DE LA CHALEUR SUR LES CUIRS**

Dans le cas de notre étude, nous nous intéresserons tout particulièrement aux expositions à de fortes chaleurs comme lors d'un incendie. La température atteinte au sein de la flamme se situe entre 1000 et 2000°C et entre 600 et 1000°C dans le « panache thermique ».

De nombreux incendies de bibliothèques sont tristement célèbres, il faut bien sûr noter que l'ensemble des incendies ayant ravagé les bibliothèques et archives n'ont pas forcément été répertoriés. Outre ceux dont la cause est accidentelle, certains ont été causés de façon volontaire ou par temps de guerre. La seconde guerre mondiale a engendré la destruction de bibliothèques et de livres, notamment lors du grand autodafé du 10 mai 1933 au cours duquel 20 000 livres ont été brûlés (« Il y a 80 ans, les nazis brûlaient les livres des grands intellectuels allemands » 2015). En 1944, lors de la libération de Paris, les allemands ont incendié la bibliothèque de l'Assemblée Nationale au Palais Bourbon, détruisant près de 40 000 volumes, notamment ceux consacrés à la science, à la théologie et aux arts.

Plus récemment, en 1994 (le 1<sup>er</sup> août), l'incendie de la bibliothèque centrale de Norwich en Grande Bretagne a provoqué la destruction de plus de 350 000 ouvrages (« Au catalogue des cauchemars : le feu < Essentiam, la maison des Livres Anciens » 2015). De même en 2004 (le 2 septembre) la bibliothèque Anna-Amalia de Weimar (Allemagne) a été ravagée par un incendie. Le nombre d'ouvrages ravagés par le feu et perdus est estimé à 50 000 (principalement des éditions du XVI<sup>e</sup> au XVIII<sup>e</sup> siècle). Lors d'un incendie il ne faut pas négliger l'impact de l'eau sur ces ouvrages exposés à la chaleur. Ainsi on comptait près de 62 000 ouvrages brûlés et gorgés d'eau, dans des états plus ou moins graves. Ces ouvrages ont été congelés (Gabel 2004).

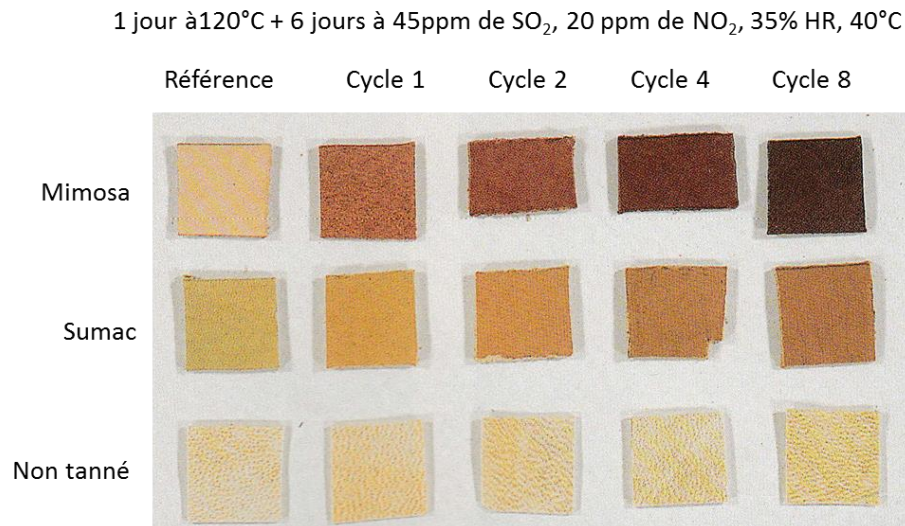
L'exposition d'un cuir à la chaleur va avoir un impact aux différentes échelles du matériau et modifier ses propriétés.

Lors de l'incendie, les objets/matériaux ne sont pas tous touchés avec la même gravité. Certains, épargnés par les flammes auront subi une montée en température élevée, d'autres serrés sur des étagères auront été épargnés car peu en contact avec une atmosphère inflammable, enfin certains auront été mis au contact d'eau après l'exposition lors des tentatives d'étouffement de l'incendie. C'est pourquoi les effets de la chaleur en condition de chaleur sèche et humide mais également en atmosphère dépourvue d'oxygène seront abordés.

Afin d'élargir la discussion sur les effets de la chaleur et les possibilités de traitement, un parallèle sera fait parfois avec les effets de la chaleur sur la peau humaine dans le cas de brûlures au 3<sup>ème</sup> degré qui correspondent à une destruction totale de l'épiderme et de l'ensemble du derme.

## I. MODIFICATION DES PROPRIETES : VISUELLES, MECANIQUES

Au niveau des propriétés visuelles, l'exposition des cuirs à la chaleur induit un brunissement des échantillons comme indiqué dans la **Figure 38**.



*Figure 38 : Changements de couleur des échantillons de cuirs de tannage mimosa, sumac ou non tannés après plusieurs cycles d'exposition à la chaleur pendant 1 jour à 120°C, suivi de 6 jours d'exposition dans une atmosphère polluée à 40°C (Larsen, Vest, et Calnan 1994).*

Dans le cas de molécules de collagène non tannées, l'exposition à la chaleur entraîne une perte de masse et une augmentation du taux d'azote. Par ailleurs, l'exposition à une chaleur sèche diminue les capacités d'absorption d'eau. D'après Cassel et son équipe, il semblerait que ce phénomène soit la conséquence d'une perte considérable de groupements latéraux polaires par élimination ou condensation au niveau des protéines. Par ailleurs, il peut y avoir des changements au niveau de la structure provoquant une diminution de la surface des échantillons (Cassel 1958).

Lorsqu'un matériau fait de collagène est exposé à une chaleur dite sèche, une augmentation de son acidité est observée. Cette augmentation de l'acidité est plus marquée dans le cas de tests en atmosphère saturée en O<sub>2</sub> que dans l'air ou dans une atmosphère sous vide (Cassel 1958). Le phénomène d'acidification observée lors de l'exposition à une chaleur sèche est dû à un phénomène d'oxydation.

L'exposition à une chaleur sèche provoque une perte des propriétés mécaniques, mise en évidence par mesure de la résistance à la traction. L'effet est encore plus prononcé dans le cas d'une atmosphère contenant de l'oxygène (O<sub>2</sub> ou air) que dans le cas d'une atmosphère sans oxygène (hélium) (**Figure 39**).

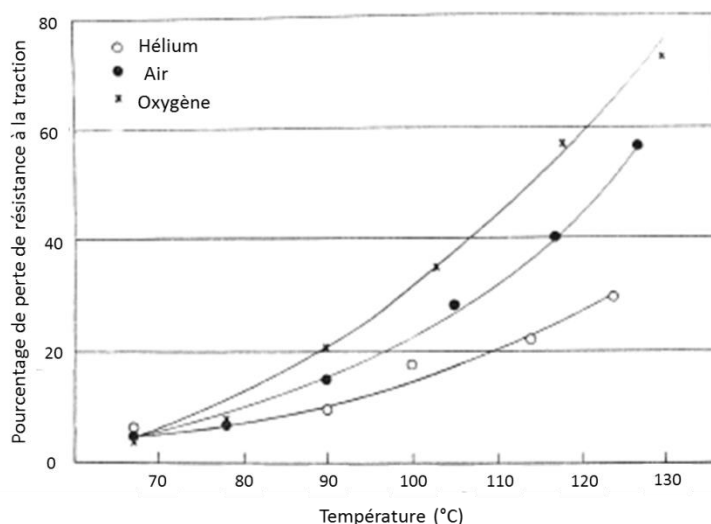


Figure 39 : Effet de la température et de l'atmosphère sur le pourcentage de perte de résistance à la traction de cuirs (Kanagy 1940).

Il semblerait d'après Kanagy que la perte de résistance à la traction après exposition à la chaleur soit proportionnelle au nombre de liens stabilisateurs de la structure rompus. La présence d'une atmosphère humide a un impact sur les propriétés de résistance mécanique et provoque une perte dans le cas où le pH du cuir est inférieur à 3 (Kanagy 1940).

## II. IMPACT AU NIVEAU CHIMIQUE, BIOCHIMIQUE

D'un point de vue général, les effets de la chaleur sont très dévastateurs dans le cas d'un matériau inerte, non vivant, tel que le cuir puisqu'ils s'additionnent aux dommages préexistants qui peuvent être de type environnemental, microbiologique ou encore mécanique. (Reid et van de Wetering 2012). Par ailleurs, en fonction de la localisation du matériau lors d'un incendie, les dégâts causés par le feu peuvent être combinés avec ceux de l'arrosage du site (Buchanan 1990).

### II.1. AGREGATION PROTEIQUE

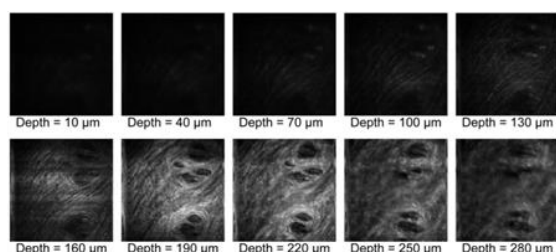
L'exposition à la chaleur provoque un transfert d'énergie cinétique et l'augmentation du nombre de collisions entre molécules adjacentes. Dans le cas d'un polymère, l'augmentation des mouvements moléculaires est tellement importante que les liens permettant le maintien des chaînes assemblées se rompent. Le cuir peut être présenté comme un polymère complexe. L'exposition à la chaleur peut conduire à une dégradation thermique de la molécule de collagène entraînant une séparation des trois chaînes de la triple hélice.

De manière générale, à la suite des changements conformationnels induits par l'exposition à la chaleur, des interactions protéines-protéines ont lieu, notamment au niveau des régions hydrophobes conduisant à la formation d'agrégats protéiques (Tornberg 2005).

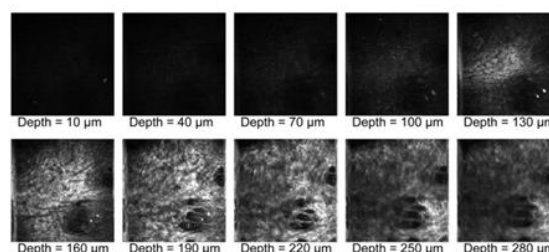


Dans le cas des brûlures de la peau, l'équipe de Tanaka *et al.* ont observé par Optical Coherence Tomographie (OCT) une agrégation des molécules de collagène (Tanaka et al. 2013). En effet, sous l'effet de la chaleur, la molécule de collagène perd sa structure et adopte une structure aléatoire (random coil). La rupture des liaisons intra et intermoléculaires du collagène provoque une désorganisation de la structure régulière des molécules de collagène à l'origine de la perte de sa propriété de biréfringence (Pierce et al. 2004). L'étude est menée sur des peaux de souris immergées pendant 10 secondes dans de l'eau à différentes températures. La première condition est de 10 secondes à 70°C, la deuxième : 10 secondes à 78°C et la dernière 10 secondes à 98°C (Tanaka et al. 2013) (cf **Figure 40**).

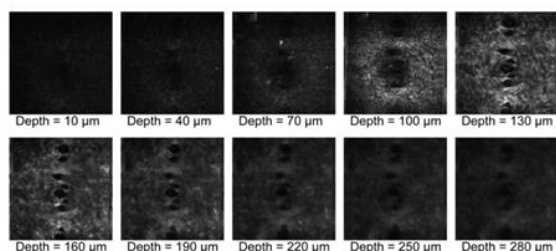
#### Témoin – collagène état physiologique



#### Après immersion dans l'eau chaude 10 secondes à 70°C



#### Après immersion dans l'eau chaude 10 secondes à 78°C



#### Après immersion dans l'eau chaude 10 secondes à 98°C

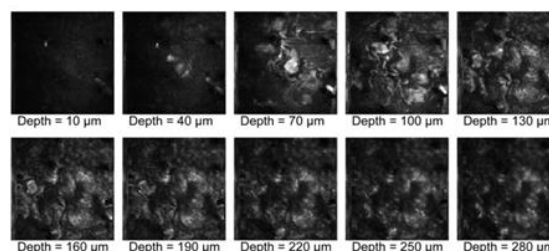


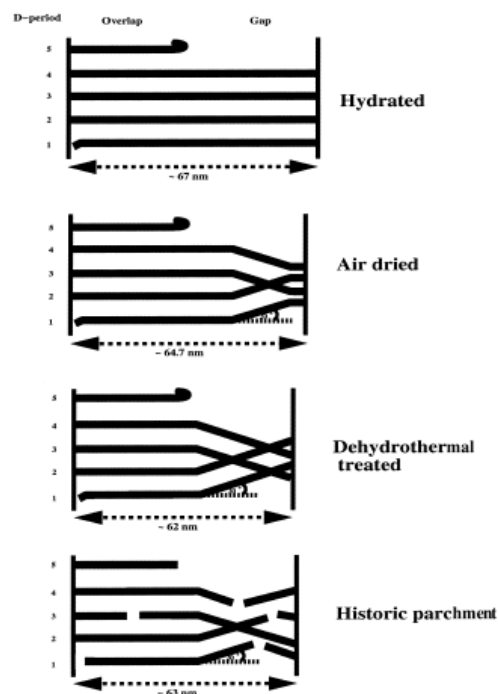
Figure 40 : Observation des molécules de collagène présentes dans la peau de souris après brûlures dans l'eau pendant 10 secondes à différentes températures (70,78 ou 98°C) (Tanaka et al. 2013)

Les auteurs remarquent que la profondeur à partir de laquelle une image est obtenue varie en fonction de l'échantillon, signe d'une diminution de l'épaisseur de l'épiderme due à une dénaturation suite à la brûlure. L'aspect des fibres de collagène diffère en fonction de l'échantillon. Dans le cas du contrôle, de fines fibres de collagène sont observées au niveau du derme papillaire et des fibres plus épaisses au niveau du derme réticulaire. Les observations faites dans le cas des échantillons brûlés montrent que l'effet est visible sur l'ensemble de l'épaisseur. Après immersion pendant 10 secondes dans une eau à 70°C la structure de la molécule de collagène n'est pas trop affectée en comparaison des autres échantillons brûlés. Après 10 secondes à 78°C, la structure fibreuse du collagène est totalement perdue et est sous une forme amorphe. Après 10 secondes à 98°C, les molécules de collagène perdent leur structure et forment des agrégats (Tanaka et al. 2013).

## II.2. DESHYDRATATION DES MOLECULES DE COLLAGENE

L'augmentation de température entraîne une déshydratation du cuir. Dans le cas d'une déshydratation extrême, l'eau environnant la triple hélice est supprimée. Les composés internes se concentrent (Florian 2006), les fibres sont alors suffisamment proches pour permettre la formation de liaisons chimiques supplémentaires (liaisons covalentes irréversibles). Ce phénomène a pour conséquence d'affecter la résistance du cuir par fragilisation du réseau de fibres faisant paraître le cuir plus rigide (Covington et Covington 2009).

La déshydratation des molécules de collagène et des fibres de collagène conduit à un raccourcissement de la période D intermoléculaire de la molécule de collagène (**Figure 41**) (Wess et Orgel 2000) . En cas de déshydratation la « période D intermoléculaire » est réduite à 64nm (Kennedy et Wess 2003). Le schéma ci-dessous illustre le phénomène.



*Figure 41 : Conséquences de la déshydratation des molécules de collagène sur les variations de période D intermoléculaires.*

Il existe une relation entre le taux d'humidité relative du matériau et les facteurs environnementaux tels que la température et l'air ambiant. Ainsi, les fluctuations même modérées, de chaleur peuvent avoir des effets à long terme. Elles peuvent notamment entraîner une perte des capacités du cuir à être hygroscopique, c'est-à-dire à absorber l'eau sous forme de vapeur contenue dans l'air ; le cuir perd alors ses capacités de réhydratation et devient dur et cassant. La réduction d'eau intrinsèque du cuir induit une augmentation de la concentration des composés chimiques internes du cuir (Kite et Thomson 2006; Thomson 2006b).

Le tannage des cuirs aide à conserver la structure de la peau en retardant les phénomènes de ruptures hydrolytiques et réduisant la solubilité du collagène. En effet, les réticulations créées par le tannage permettent un maintien de la structure moléculaire malgré les coupures hydrolytiques. En revanche, il semblerait que l'utilisation de tannins végétaux ne soit pas très efficace pour maintenir la structure moléculaire du collagène, car les liaisons créées seraient certes nombreuses mais faibles (Bowes et Cater 1965; Bowes et Raistrick 1967).

### II.3. CHALEUR SECHE : PHENOMENE DE THERMO-OXYDATION

L'exposition des molécules de collagène à une chaleur sèche induit une perte de la structure hélicoïdale, une réticulation entre les chaînes ainsi que des ruptures oxydantes de la chaîne polypeptidique faisant apparaître des petits fragments protéiques. Ce phénomène appelé thermo-oxydation provoque également la modification et la perte d'acides aminés, transformés en  $\text{NH}_3$  (Chahine 2013). Les acides aminés hydroxylés sont sensibles à ces phénomènes d'oxydation (Cassel 1958). Les acides aminés les plus touchés sont la méthionine, la tyrosine, l'arginine, la lysine, la sérine et l'histidine (dans cet ordre). Les pertes en arginine et lysine sont élevées les premiers temps contrairement à la perte de sérine et thréonine qui reste stable au cours du temps. La dégradation des acides aminés entraîne la production de composés volatils tels que de l'ammoniac, du dioxyde de carbone et d'autres produits non identifiés (Bowes et Taylor 1970).

Dans le cas du cuir il apparaît que plus le degré de réticulation est élevé, plus le phénomène de thermo-oxydation sera important (Popescu et al. 2008). Tout comme le phénomène d'oxydation observé dans le cas des cuirs anciens, le phénomène de thermo-oxydation entraîne une acidification des cuirs induite par une diminution du taux d'acides aminés basiques au profit d'acides aminés acides. L'exposition d'un cuir de tannage végétal en condition de chaleur sèche provoque l'apparition de groupements amides et carbonyles accompagnée d'une perte de poids due à la déshydratation, une perte en acides aminés et une production d'ammoniac et gaz carbonique. Le mécanisme de scission de la chaîne polypeptidique est le même que celui décrit (§partie 2 :A.II.2) (Chahine 2013).

### II.4. CHALEUR HUMIDE : PHENOMENE D'HYDROLYSE ET DENATURATION HYDROTHERMIQUE

L'exposition des peaux/cuirs à des chaleurs humides entraîne deux types de dégradation qui semblent se produire simultanément : les dénaturations hydrothermiques et les hydrolyses (Chahine 2013). Elles conduisent toutes deux à une diminution de l'organisation de la structure de la molécule de collagène (Bowes et Raistrick 1967) la rendant instable (Badea, Gatta, et Budrugaec 2011).

#### I.4.1. Dénaturation hydrothermique

La dégradation du collagène dans des conditions de chaleur humide se traduit par une perte de la structure hélicoïdale de la triple chaîne de collagène qui conduit à une désorganisation de la structure moléculaire similaire à ce qui se produit lors de la transformation du collagène en gélatine (Bowes et Cater 1965; Bowes et Raistrick 1967). Ce phénomène, qui correspond à une transition de type « hélice »  $\Leftrightarrow$  random coil, n'est réversible que lors des premières étapes du processus, lorsque la triple hélice de collagène a peu perdu sa structure et que les chaînes peuvent retrouver leur conformation initiale. L'exposition prolongée à une chaleur humide provoque une perte de structure importante au niveau de la triple hélice de collagène ; les molécules de collagène ne peuvent alors plus retrouver leur structure hélicoïdale. Lors de la réaction un rétrécissement de la structure des

fibres est observé. Les principales étapes de ce phénomène, sont décrites ci-dessous (Covington et Covington 2009) :

Forme intacte  $\Leftrightarrow$  contraction  $\rightarrow$  agrégation  $\rightarrow$  transformation en gélatine  $\rightarrow$  solubilisation

Lorsque les molécules de collagène sont tannées, lors de la réaction de dégradation, le collagène reste dans un état agrégé, les étapes de transformation en gélatine et solubilisation n'ont pas lieu.

Les variations de pH lors de l'exposition à une chaleur humide engendrent également des modifications importantes au niveau de la structure :

- A pH alcalin, dans un premier temps est observé une « ondulation » (crimping) des fibres puis une hydrolyse rapide accompagnée d'une solubilisation accélérée des fibres.
- A pH acide, la réaction d'hydrolyse est ralentie et le phénomène d'ondulation des fibres moins prononcé. Des chaînes de collagène cassées et des fragments de collagène peuvent être observés. Ce phénomène a pour conséquence lors du séchage des peaux une « cimentation » de la structure fibreuse conduisant à l'obtention d'un matériel fragilisé.

#### II.4.2. Hydrolyse

L'exposition des molécules de collagène dans des conditions de chaleur humide provoque une rupture des chaînes polypeptidiques due à une hydrolyse. Cette hydrolyse se produit au niveau de la liaison peptidique selon le même mécanisme que celui décrit dans le cas des détériorations naturelles et conduit au relargage de groupements carboxyliques et  $\alpha$  aminés. Le phénomène de rupture hydrolytique est exacerbé dans des conditions de pH acide ( Bowes et Cater 1965; Bowes et Raistrick 1967; Chahine 2013). La figure ci-dessous (**Figure 42**) met en évidence la stabilisation des molécules de collagène grâce aux tannins.

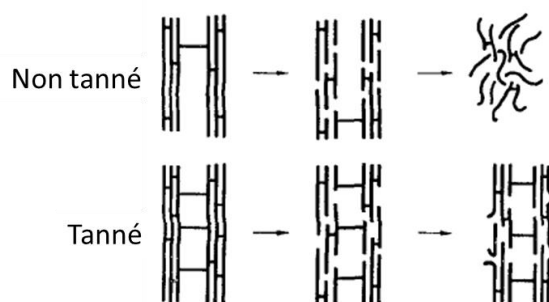


Figure 42 : Représentation schématique de la rupture par hydrolyse de molécules de collagène non tannées ou tannées en condition de chaleur humide. La présence de tannin stabilise les molécules de collagène et retarde sa désorganisation. (Bowes et Cater 1965).

Ce phénomène provoque une diminution de la stabilité hydrothermique (Chahine 2013).

Comme décrit dans les deux paragraphes précédents, l'exposition d'un cuir dans des conditions de chaleur sèche ou humide conduit à la dégradation du matériau selon des processus observés dans le cas de détériorations classiques dues au vieillissement naturel des cuirs et à certains défauts de

conservation. Une exposition à la chaleur en condition sèche ou humide constitue un protocole de vieillissement artificiel accéléré, méthode largement utilisée de nos jours. (Projet STEP). Des modèles peuvent ainsi être créés afin de reproduire artificiellement certaines détériorations observables dans le cas de vieillissements naturels (René Larsen 1999).

### III. APPROCHES ACTUELLES DE CONSERVATION / RESTAURATION

Il existe un très grand nombre de techniques et produits de restauration adaptés aux cuirs. Nous ne présenterons ici que les techniques actuellement utilisées dans le cas d'une exposition à la chaleur.

Compte tenu que tous les ouvrages exposés à des incendies n'ont pas le même type de détérioration (certains, endommagés par la chaleur environnante, d'autres calcinés, certains protégés du fait de leur place dans un rayonnage, d'autres encore, endommagés, aussi par l'eau, ...), la restauration reste difficile et coûteuse. S'il est impératif de garder les ouvrages les plus rares, les plus précieux, la restauration n'est pas toujours le choix premier, certains ouvrages seront simplement remplacés. Ce choix s'explique par le fait que celle-ci permet rarement de redonner aux ouvrages leur aspect initial. Par exemple dans le cas d'ouvrages humides, ils devront nécessairement passer par une phase de congélation afin d'être stabilisés dans l'attente d'un traitement (Buchanan 1990).

Comme abordé précédemment, le défaut principal d'un cuir exposé à la chaleur est la perte de souplesse et à l'heure actuelle il n'existe pas de traitement de restauration pour ces cuirs. Rigides et cassants leur manipulation n'est plus envisageable. Ainsi un traitement de ces cuirs par les mêmes méthodes que celles employées dans le cas des cuirs anciens dans un but de restitution de leur souplesse pourrait être envisagé. Les méthodes les plus couramment utilisées pour le nettoyage et pour redonner de la souplesse aux cuirs anciens seront présentées dans un premier temps.

#### III.1.NETTOYAGE AU SAVON BRECKNELL

Le nettoyage du cuir peut être réalisé à sec par utilisation de gommes, brosses, solvants organiques (alcool, white spirit pour enlever certaines taches) ou en condition humide (savon additionné de détergents).

Le savon Brecknell est un savon à base de solvant dont la composition est gardée secrète. Utilisé à l'origine dans l'entretien des selles en cuir, son utilisation s'est élargie auprès des conservateurs/restaurateurs dans un but de nettoyage mais également d'assouplissement dans le cas de cuirs très raides.

L'analyse chimique du savon Brecknell a révélé un savon alcalin de soude (du palmitate très certainement), son pH est de 9,7. L'application du savon Brecknell en petite quantité sur des cuirs en bon état, ne provoque pas de diminution de la stabilité hydrothermique. Cependant localement des modifications de couleur (tendance à foncer) accompagnées de tache blanchâtres sont observables. Outre que l'application sur des cuirs anciens provoque des retraits dimensionnels, l'utilisation d'une éponge humide est essentielle pour enlever l'excédent de savon et permet d'éviter des dommages supplémentaires, la surface des cuirs anciens étant très souvent déjà très détériorée.

L'utilisation de ce savon doit rester exceptionnelle, seulement dans le cas d'un nettoyage indispensable.

### III.2.LA LUBRIFICATION

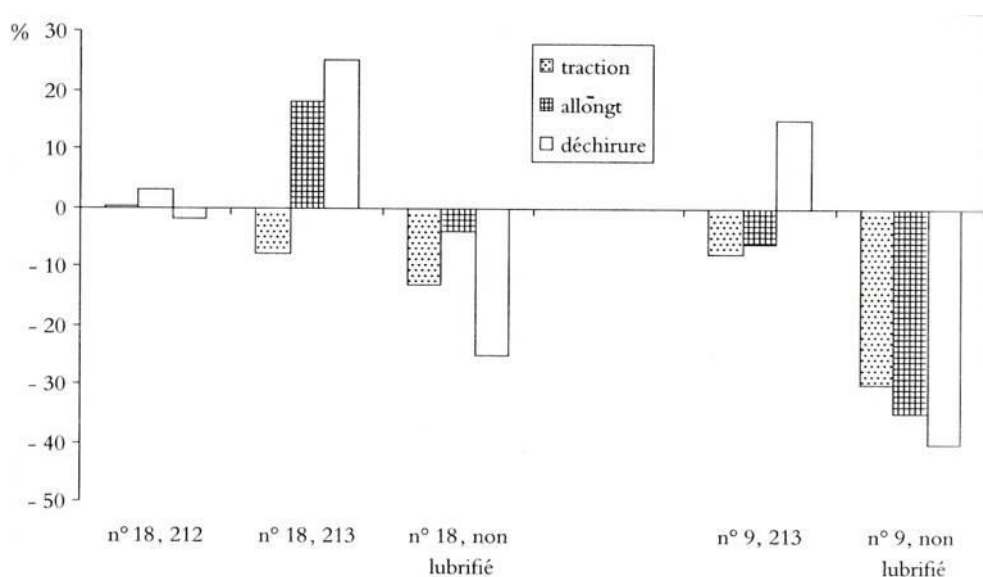
La lubrification d'un cuir n'est pas systématique. Elle est réalisée dans le but de redonner aux cuirs leurs propriétés caractéristiques : toucher agréable, souplesse, bonne résistance mécanique (Chahine 2013). Un cuir stocké dans une atmosphère trop sèche et ayant perdu son hydratation initiale, est difficile à réhydrater, la lubrification permet de lui redonner ses propriétés.

Lorsqu'elle est possible l'application de lubrifiants sur la face chair donne de meilleurs résultats que sur la face fleur. Les lubrifiants constituent également un moyen de protection contre les polluants extérieurs, la présence de substances auxiliaires telle que la cire d'abeille, en surface du cuir, permet de ralentir l'absorption de gaz polluants tels que le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>).

Parmi les lubrifiants les plus connus et plus souvent utilisés peuvent être cités la cire 212 et la cire 213, émulsions contenant un solvant. La cire 212 contient entre autre des cires microcristallines, un fongicide et un insecticide. La cire 213 est à base d'huile de pied de bœuf et de cire d'abeille.

Les effets de ces émulsions sur les cuirs ont été étudiés par Chahine *et al.* dès 1989. Une première série de cuirs neufs, de veau tannés végétalement, a été enduite de cire 212 ou 213, puis placée pendant 10 ans dans un milieu ayant une pollution urbaine, suspendu dans le sous-sol de la BnF. Une seconde série de cuirs a elle été placée pendant 30 semaines en caisson afin de réaliser un vieillissement artificiel en atmosphère polluée (25ppm de SO<sub>2</sub>, 10ppm de NO<sub>2</sub>, 27°C et 90% d'HR). Les témoins correspondants ont été conservés dans l'obscurité, à 23°C et 50% d'HR.

A la suite de l'étude, les pourcentages de perte ou de gain sur la résistance à la traction, l'allongement à la rupture et la résistance à la déchirure ont été étudiés. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 43**.



*Figure 43 : Effets de l'application de lubrifiants (cire 212 ou cire 213) sur des cuirs soumis à une pollution artificielle pendant 30 semaines (cuir n°18) ou conservé 10 ans sur site pollué (cuir n°9) (Chahine 2013).*

Les résultats obtenus mettent en évidence un gain au niveau des propriétés des cuirs traités par rapport aux témoins non traités. Les résultats sont meilleurs dans le cas de l'utilisation de la cire 213 que de la cire 212. La résistance à la déchirure est largement augmentée (jusqu'à 25 % plus élevée)

ainsi que les capacités d'allongement. Protégés de la pollution, l'hydrolyse acide est diminuée au sein des cuirs. Celle-ci n'entraîne donc pas de perte de propriétés mécaniques.

A l'heure actuelle l'application de traitements utilisés couramment dans le cas de détériorations classiques afin de redonner de la souplesse aux cuirs, ne constitue pas une technique de restauration de ces cuirs chauffés, sans doute par manque d'efficacité. Par ailleurs certains traitements et notamment l'usage de lubrifiants largement utilisés il y a quelques années sont aujourd'hui contestés car ils entraînent des dommages à plus long terme.

Dans les cas où seule la couverture d'ouvrages est atteinte, les reliures sont ôtées, jetées et remplacées par d'autres, achetées ou confectionnées à la main (Buchanan 1990).

Les reliures de cuir ont un rôle de protection ; en matière de restauration, une des premières difficultés est de redonner au cuir cette fonction, tout en conservant d'une part l'esthétique et d'autre part les informations qu'elles contiennent. Les techniques de conservation et restauration ont évolué au cours du temps. Le remplacement des reliures anciennes par une reliure moderne ainsi que les re-reliures ne sont effectuées que dans le cas où cela est nécessaire en veillant à conserver les fragments originaux afin de permettre leur étude future (Chahine 2013).

Partant du constat que les techniques de restauration sont difficiles à mettre en œuvre et coûteuses, l'idée de développer une nouvelle stratégie de restauration est née.

Comme décrit précédemment, l'exposition à la chaleur d'un matériau de type peau entraîne une agrégation des constituants protéiques.

Dans le monde de la biochimie de nombreuses études utilisent les enzymes de type protéase pour permettre la rupture d'agrégats protéiques. Il existe un grand nombre de protéases différentes et chacune possède un mécanisme d'action qui lui est propre.

Pour poursuivre l'analogie entre cuir exposé à la chaleur et derme brûlé, on peut mentionner les traitements biochimiques mis au point récemment pour le débridement des brûlures.

Inspirée du débridement physiologique, l'utilisation de gels enzymatiques pourrait réduire le nombre des excisions chirurgicales qui ne permettent pas d'épargner le tissu sain (Singer et al. 2010). Parmi les enzymes utilisées, on retrouve la collagénase (Ramundo et Gray 2009).

En 2012, l'agence européenne des médicaments (EMA) a recommandé l'utilisation du gel de débridement des plaies à base de bromélaïne, enzyme protéolytique extraite de la tige de l'ananas utilisée dans la confection du gel Nexobrid®.

Aucun procédé de restauration utilisant des molécules biologiques de type enzyme pour redonner de la souplesse aux cuirs n'a jamais été testé, c'est ce que propose cette étude.

## En résumé

De manière générale, l'exposition d'un cuir à la chaleur induit à l'échelle macroscopique une coloration de type brunissement accompagné d'une rigidification des échantillons. Ces phénomènes sont accompagnés d'une déshydratation de l'ensemble du matériau ainsi que de l'agrégation des molécules de collagène. Une scission du collagène est également observée, le mécanisme dépend du type de chaleur, sèche il s'agira d'une oxydation, humide, d'une hydrolyse.

A l'heure actuelle, les techniques de restauration sont limitées. Celles utilisées dans le cas d'altérations classiques dans le but de redonner de la souplesse aux cuirs ne semblent pas convenir et la seule solution consiste à remplacer le cuir abîmé par un cuir neuf.



# Objectifs des travaux

Les objets du patrimoine sont des témoins du passé qu'il faut réussir à transmettre aux générations futures. Les matériaux en cuirs étant confectionnés à partir de peaux et possédant de nombreuses propriétés de résistance, entre autres, à la putréfaction, ils ont été utilisés de manière ancestrale, notamment pour la confection de vêtements, chaussures, instruments de musique ou encore reliures.

Bien que les cas d'incendies soient peu fréquents, ils constituent un facteur de perte à ne pas négliger. Dans le cas de cuirs, l'exposition à la chaleur, qu'elle soit sèche ou humide, induit d'importantes modifications au niveau des propriétés des cuirs, notamment mécaniques, traduites par une perte importante de la souplesse du matériau.

Au niveau biochimique, les études réalisées dans le cas du cuir mettent en évidence des phénomènes de thermo-oxydation et/ou d'hydrolyse conduisant à la fragmentation de la molécule de collagène. Par ailleurs, l'étude des conséquences de brûlures et l'effet de la chaleur sur la molécule de collagène ont mis en évidence une déshydratation accompagnée d'une agrégation des molécules de collagène.

Inspiré des processus physiologiques de réparation cutanée ainsi que des traitements enzymatiques développés dans le cas de brûlures, l'objectif de notre étude est d'essayer de transposer les traitements enzymatiques aux cuirs endommagés par la chaleur afin de restaurer leurs propriétés, notamment de souplesse.

Le premier objectif de ce travail est de mettre en évidence et de caractériser les modifications à différentes échelles engendrées sur les cuirs suite à une exposition à la chaleur. Pour cela, des échantillons de cuir ont été exposés à la chaleur dans des conditions contrôlées, puis caractérisés par un ensemble de méthodes d'analyses physico-chimiques et biochimiques. L'apparition d'un phénomène d'agrégation protéique sera particulièrement recherché.

Le deuxième objectif de ce travail est de développer un support de traitement enzymatique contenant des protéases afin de rompre les agrégats protéiques néoformés conséquence de l'exposition à la chaleur.

## Section expérimentale

## **PARTIE 1 : MATERIEL**

### **A. Les cuirs**

Lors de la présente étude, différents cuirs ont été étudiés. Ces cuirs, tous issus d'une peau de veau ou de bovin, ont subi un processus de tannage dit végétal. Au cours de l'étude ils pourront être classés en différents groupes selon le type de tannage végétal qui leur a été appliqué (tannins hydrolysables ou condensés).

#### **I. CUIR DE BOVIN, TANNAGE VEGETAL AU MIMOSA**

Ce cuir constitue le matériel de base utilisé lors de nos études de caractérisation et essais de restauration. Tout au long de cette étude il sera dénommé CM. La transformation de cette peau en cuir a été faite à façon (en 2013) par l'institut ICPI (Leather and Footwear Research Institute – Bucarest, Roumanie), laboratoire de recherche travaillant sur les cuirs.

Le protocole de préparation de cette peau est détaillé en annexe (Annexe 1). Le tannage a été effectué à partir d'extrait tannant de mimosa (tannins condensés). Deux peaux ont été utilisées pour notre étude.

#### **II. CUIR DE VEAU, TANNAGE VEGETAL AU SUMAC OU AU MIMOSA**

Ces cuirs ont fait l'objet d'études lors du projet européen STEP LEATHER PROJECT « protection and Conservation of European Culturage Heritage », (1991-1994).

Le protocole expérimental de fabrication de ces peaux est donné en annexe (Annexe 2). Les peaux ont été séparées en deux selon le sens « tête-queue ». Chaque demi-peau a été tannée, soit au mimosa (tannins condensés), soit au sumac (tannins hydrolysables).

Les cuirs, numérotés (11, 13, 16 et 18 pour les cuirs sumac, et 2 pour le cuir mimosa), ont été conservés pendant 20 ans repliés dans un emballage papier à température et atmosphère ambiantes. Lors de notre étude, ces cuirs seront dénommés CM STEP dans le cas de cuir tannés au mimosa et CS dans le cas de cuirs tannés au sumac. Dans le cas des cuirs de tannage au sumac chaque cuir sera identifié par une lettre allant de A à D. Un parallèle pourra ainsi être réalisé entre cuirs de tannage au sumac et au mimosa.

#### **III. CUIR DE VEAU, TANNAGE VEGETAL DE TYPE INCONNU**

Deux cuirs de veau ont été acquis en 2012 auprès de la société RELMA, spécialisée dans la vente de cuir et fournisseur des Archives Nationales. Une des deux est colorée (teinte couleur havane) et l'autre dite « naturelle » ne l'est pas. Aucune information n'a pu être recueillie concernant le protocole de fabrication ni concernant le type de végétal utilisé lors tannage. Le type de tannage végétal sera dit « inconnu ». La caractérisation de ces cuirs a permis la comparaison de leur profil avec les différents types de cuirs, ils seront dénommés Cuirs RELMA.

#### IV. CUIR DE VEAU HISTORIQUE, TANNAGE VEGETAL DE TYPE INCONNU

Un cuir de veau provenant d'une couverture d'ouvrage daté du XIXe siècle nous a été fourni par les Archives Nationales. Seule l'année de l'ouvrage ainsi que son mode d'apprêtement (au blanc d'œuf) sont connus. Ce cuir nous servira à réaliser quelques essais de restauration par voie enzymatique.

#### V. PARCHEMIN

Le parchemin étudié est obtenu à partir d'une peau de veau. Les protéines du parchemin se trouvent dans une conformation relativement proche de celle d'un cuir dans le sens où tout le début du processus de fabrication d'un cuir et d'un parchemin est commun et que le matériau de base est identique. En revanche, les parchemins diffèrent du cuir car aucun tannage n'est réalisé lors de leur confection.

### B. Les enzymes

L'ensemble des enzymes utilisées lors de notre étude ont été incluses dans différents support de restauration enzymatique.

#### I. L'ESPERASE

L'espérase est une sérine protéase sécrétée par *Bacillus Species*. Très performante dans des conditions de température et pH élevés, elle est capable d'hydrolyser les liaisons peptidiques au sein des protéines. L'espérase est stabilisée par la présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et peut être inactivée par l'utilisation d'inhibiteurs des sites actifs de type serine tel que le phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) et le diisopropylfluorophosphate. La mesure de l'activité enzymatique de chaque lot utilisé, a été réalisée par mesure de l'hydrolyse sur un peptide spécifique de cette protéase : le N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (PM=625g/mol) qui porte un groupement hydrophobe en substitution du groupement carboxylique du résidu phenylalanine terminal. L'activité des enzymes utilisées (P5860 – Sigma Aldrich) varie entre 2400 et 3200 U.mL<sup>-1</sup>.

#### II. LA COLLAGENASE

La collagénase utilisée correspond à un ensemble d'enzymes (collagénase, protéases non spécifiques, et clostripaine), sécrétées par *Clostridium histolyticum*, possédant la capacité de dégrader le collagène. L'enzyme, dont le pH optimal se situe entre 6,3 et 8,8 reconnaît spécifiquement la séquence -/Gly ou -R-Pro-/X-Gly-Pro-R où X est souvent un acide aminé acide. La collagénase est activée en présence de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et est inhibée en présence d'éthylène glycol-bis (beta-aminoethylether)- N,N,N',N'-tretraaceticacid, de  $\beta$ -mercaptoéthanol, de glutathione, de thioglycolic acide et de 8-hydroxyquinoline. L'activité de l'enzyme (C0130 – Sigma Aldrich) utilisée est de 500U.mg<sup>-1</sup>.

### III. LA PEPSINE

La pepsine représente la principale enzyme protéolytique produite au niveau de l'estomac. Elle permet la digestion de protéines grâce au clivage de liaisons peptidiques internes à la protéine. La peptidase utilisée lors de notre étude est obtenue à partir de muqueuse gastrique de porc (P7000 – Sigma Aldrich, 503 U.mg<sup>-1</sup>). Son pH optimal se situe entre 2 et 4 ; elle peut être inactivée de façon irréversible lorsqu'elle est placée à pH 8,0-8,5. Cette enzyme clive les liaisons peptidiques en aval des résidus aromatiques et hydrophobes situés en position P1 et préférentiellement la phénylalanine et la leucine ; elle ne reconnaît pas les amides et les liaisons ester. La présence de résidus soufrés au voisinage des liaisons reconnues accélère l'hydrolyse.

### IV. LA TRYPSINE

La trypsine utilisée est une sérine protéase, isolée de pancréas de bovin (T1426 – Sigma Aldrich, 12900 U.mg<sup>-1</sup>). Son pH optimal se situe entre 7 et 9 ; elle est inactivée au-delà de pH 11. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les peptides du côté C-terminal des résidus lysines et arginines. L'hydrolyse est diminuée lorsqu'un résidu acide se trouve de chaque côté du site de clivage. La présence d'ions Ca<sup>2+</sup> stabilise la trypsine en retardant son autolyse. Les résidus prolines situés en aval du site de clivage inhibent l'hydrolyse ainsi que le diisopropylfluorophosphate (DFP), Na-p-tosyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK), le phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), le 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride (APMSF), le 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonylfluoride (AEBSEF)...

### V. LA THERMOLYSINE

La thermolysine est une protéase de la famille des metallo-endoréptidases extracellulaires, thermostable issue de *Bacillus thermoproteolyticus* dans le cas de notre étude. Ses co-facteurs sont le zinc et le calcium. Sa température et son pH optimums sont respectivement de 70°C et pH 8 mais elle reste stable entre pH 5 et 9,5. La thermolysine clive les liaisons peptidiques en amont d'un résidu hydrophobe, préférentiellement à chaîne latérale volumineuse comme l'isoleucine, la leucine et la phénylalanine (dans cet ordre), mais elle reconnaît également la valine, l'alanine et la méthionine ; elle est donc peu spécifique. La thermolysine utilisée provient de chez Sigma Aldrich (P1512 – 37 U.mg<sup>-1</sup>).

### VI. LA TRANSGLUTAMINASE

La transglutaminase est une enzyme extracellulaire produite par *Streptovorticilium* sp. Elle est calcium dépendante et catalyse l'incorporation d'amines de petit poids moléculaire au niveau des sites  $\gamma$ -glutamine des protéines ainsi que la réticulation de protéines conduisant à la formation de liaisons isopeptidiques  $\gamma$ -glutamyl- $\epsilon$ -lysine.

La transglutaminase peut être inhibée en présence d'iodoacetamide et de N-éthylmaleimide en présence de calcium.

La transglutaminase utilisée lors de l'étude provient d'Ajinomoto ; c'est une enzyme industrielle qui présente une activité de  $100 \text{ U.g}^{-1}$ . Son degré de pureté est faible (1%) ; elle est stabilisée par des dextrines.

## C. Les matrices modèles et tannins

Lors de la réalisation de matrices modèles deux types de tannins ont été utilisés :

- Tannins condensés mimosa fourni par l'institut roumain ICPI
- Tannins hydrolysables sumac fourni par le CRCC

Les deux types de tannins sont conditionnés sous forme de poudres.

Ces extraits tannants ont servi à la confection de matrices modèles obtenues à partir de gels de gélatine 5% (m/v), réticulés par ajout de glutaraldéhyde et/ou extraits tannants. Les protocoles de mise en œuvre de ces matrices seront détaillés dans la partie méthode.

## D. Les supports de traitements de restauration

Différents types de supports ont été testés :

- Solution enzymatique préparées à base d'eau ou d'une solution d'HEPES pH 8 additionné ou non de chlorure de calcium incluant de la collagénase à deux concentrations : 1 et 10 U/mL.
- Gels d'agar 0,5% (m/V) confectionnés à partir d'eau ou d'une solution d'HEPES 50 mM pH 8 additionnée ou non de chlorure de calcium à 20mM. L'enzyme incluse dans les gels est la thermolysine, enzyme thermostable, à une concentration de 10U/mL
- Gels de gélatine 5% (m/V) incluant ou non une protéase : collagénase ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml}$ ) ou l'espérase ( $1,1 \cdot 10^{-3}\%$ )
- Gels de gélatine 5% (m/V) réticulés par ajout de transglutaminase (1U/mL) et incluant une protéase : collagénase ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml}$ ) ou l'espérase ( $1,1 \cdot 10^{-3}\%$ )
- Solutions contenant un co-solvant, le glycérol, à des concentrations comprises entre 0 et 9M, incluant une protéase, l'Espérase<sup>®</sup> à une concentration de 150U/mL.

L'ensemble des supports de restauration présentés ont été confectionnés en laboratoire, les protocoles de fabrication sont présentés en partie méthode.

- émulsion enzymatique Le support pour l'élaboration des traitements de restauration de type émulsion nous a été gracieusement fournis par Monsieur BAUCE de la société TRIMADEL, entreprise spécialisée dans l'entretien des cuirs. Une émulsion, de type huile dans eau, faite à façon pour notre étude a été testée. La composition exacte est un secret de fabrication et est inconnue.

## **PARTIE 2 : METHODE D'EXPOSITION A UNE CHALEUR SECHE**

*L'échantillon de cuir est placé dans une étuve pendant différentes durées à différentes températures. Trois conditions d'exposition à une chaleur sèche ont été retenues. Elles permettent une dénaturation thermique du cuir. Ces conditions sont inspirées de celles étudiées lors du projet européen STEP et peuvent constituer une méthode de vieillissement artificiel.*

Une étuve à convection naturelle et température contrôlée **Memmert UNB 200 (32L-220°C)** est utilisée lors des expositions à la chaleur. L'humidité au sein de l'étuve n'est pas contrôlée et aucune source d'humidité n'est ajoutée, la chaleur est globalement considérée comme sèche. Les échantillons sont préalablement découpés sous forme de rectangles (longueur dans le sens tête-queue) de dimensions adaptées aux différentes études. Les échantillons sont suspendus verticalement à l'intérieur de l'étuve à l'aide de pinces en métal dans le sens vertical tête – queue. Différentes durées et températures d'exposition ont été testées :

- 4 jours, 160°C, condition retenue suite à l'étude réalisée lors du projet européen STEP
- 4 jours, 100°C
- 25h, 160°C

Après exposition à la chaleur, lorsque la taille des échantillons le permettait le pourtour a été coupé sur 1 cm afin d'éviter les effets de bords. Pour l'ensemble des études de grands morceaux de cuirs ont été chauffés puis les différents échantillons ont été découpés. Dans les cas des mesures de DMA, la caractérisation des échantillons à l'état brut puis chauffé ne permet pas de recouper l'éprouvette profilée pour la mesure après exposition à la chaleur.

## **PARTIE 3 : METHODES DE CARACTERISATION**

### **I. MESURES COLORIMETRIQUES**

*Afin de définir avec précision une couleur, trois paramètres sont nécessaires. Le modèle CIELab, adopté en 1976 par la Commission Internationale de l'Eclairage(CIE) modélise la vision humaine et permet une représentation par l'utilisation de coordonnées colorimétriques selon les axes rouge-vert et bleu-jaune. Dans ce modèle, les couleurs sont représentées et caractérisées par trois composantes :*

- La luminance « L » dont les valeurs vont de 0 dans le cas du noir à une valeur de 100 dans le cas du blanc
- L'axe « a » ou axe vert – rouge
- L'axe « b » ou axe bleu – jaune

*Ainsi la couleur peut être représentée selon ces 3 axes comme décrit dans la figure ci-dessous (**Figure 44**).*



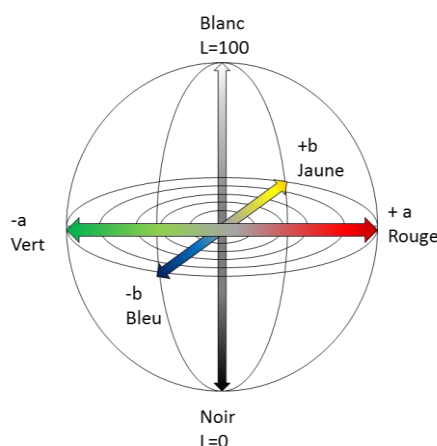


Figure 44 : Représentation des axes colorimétriques (Gonnet 1998).

Une comparaison de couleur entre échantillon est également possible par calcul de la valeur de différence de couleur  $\Delta E$ . Une différence de  $\Delta E$  supérieure à 5 est perceptible par un observateur (Mokrzycki W. S 2011). La valeur est calculée selon les équations colorimétriques standards définies dans la norme ASTM Standard D2244-93 (Standard d2244-02, standard test method for calculation of color differences from instrumentally measured color coordinates, 2003).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Dans le cas de notre étude, cette technique devrait permettre de mettre en évidence des variations de couleur après exposition à la chaleur, mais également après application de nos traitements de restauration.

Les mesures colorimétriques ont été obtenues grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre **XRite**, selon le modèle de couleur CIE  $L^*a^*b^*$ . Les données obtenues sont traitées grâce au logiciel **X-Rite Color Master**. Les conditions de mesures ont été paramétrées comme indiqué ci-après :

- Le diamètre du point de mesure est de 4mm,
- Le couple source lumineuse utilisée et angle observateur standard est du type D 65/10°, ce qui correspond à une lumière du jour avec une vision normale d'un utilisateur
- La composante spéculaire est incluse (SPIN) ce qui signifie que la luminance de l'échantillon est prise en compte.

Les mesures des coordonnées colorimétriques CIE  $L^*a^*b^*$  ont été réalisées sur l'ensemble des échantillons, face fleur et face chair, au niveau de 5 zones distinctes. Les valeurs obtenues correspondent à une moyenne des 5 valeurs obtenues pour chaque face.

Dans le cas de l'étude d'échantillons de petite taille un « gabarit modèle » a été utilisé afin de faciliter la mesure.

A partir des valeurs moyennes  $L^*a^*b^*$  mesurées par le spectrophotomètre, la différence de couleur  $\Delta E$  entre échantillons a été calculée.

## II. VARIATIONS MASSIQUES ET DIMENSIONNELLES

Les pourcentages de variation massique et dimensionnelle sont déterminés par pesée (balance de précision **Explorer pro, OHAUS**) et mesure des dimensions des échantillons à l'aide d'un pied à coulisse mécanique (Motutoyo 200mm) avant et après exposition à la chaleur.

## III. MICROSCOPIE OPTIQUE

*Les observations au microscope optique couplées à l'utilisation du logiciel Archimède permettent d'obtenir une image représentative de la surface des échantillons en s'affranchissant des effets de profondeur de champ liés à la topographie de surface par reconstruction par empilement en z (z stack). Cette technique devrait permettre de voir les différences de structure de surface avant et après exposition à la chaleur et après application du traitement.*

Les observations sont réalisées grâce à un microscope optique photonique **Axio Imager D2m(Zeiss)**. L'étude a été réalisée en réflexion en champs sombre et à différents grossissements (x10 à x500). Le focus a été réalisé pour l'ensemble de l'échantillon en le faisant varier le pas en z de 10µm à chaque acquisition (5 graduations, 1 graduation = 2µm). Les images ont été traitées et compilées grâce au logiciel **Archimède**.

## IV. OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)

*Cette technique de microscopie repose sur le principe des interactions électrons/ matière. Lors de l'analyse, un faisceau d'électrons primaires est envoyé à la surface de l'échantillon et interagit avec au niveau d'une zone / un volume d'interaction également appelé « poire de diffusion » dont le volume est d'environ 1µm<sup>3</sup>, comme décrit dans le schéma ci-dessous (**Figure 45**).*

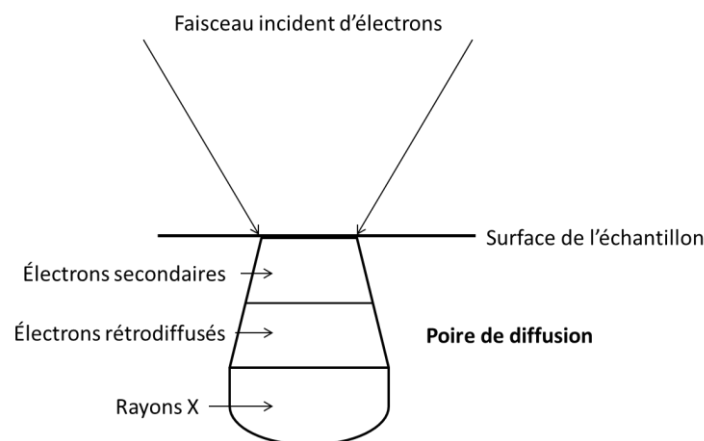


Figure 45 : Illustration de la poire de diffusion.

*Suite à un réarrangement du noyau électronique au niveau de l'atome, l'échantillon va en réponse réémettre différents types de particules (**Figure 46**), notamment des électrons rétrodiffusés et secondaires.*

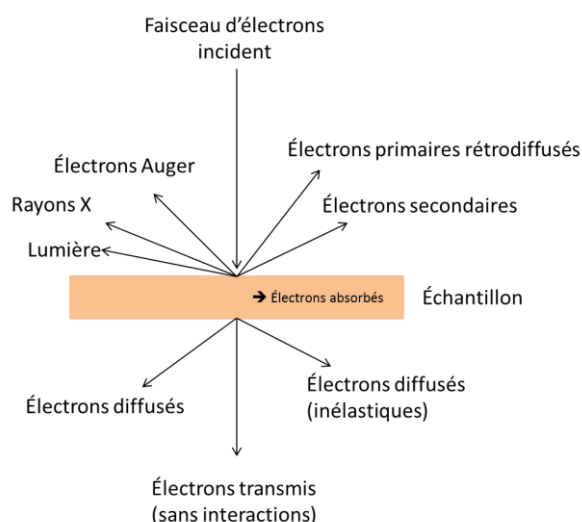


Figure 46: Représentation schématique des particules réémises en réponse du faisceau d'électrons incident.

- Les électrons rétrodiffusés : réémis de manière élastique après avoir percuté la surface ils ne perdent que peu d'énergie. Ces électrons sont facilement ôtés du nuage électronique. Ce type d'électrons permet d'obtenir des informations concernant la chimie de l'échantillon (composition chimique).

- Les électrons secondaires : ils proviennent de couche plus profonde du nuage électronique. Ils sont éjectés lorsque les électrons primaires ionisent les atomes à la surface de l'échantillon. Ces électrons, de faible énergie, permettent de reconstruire une image de la surface (relief, topographie), l'intensité du signal détecté dépendant du relief de l'échantillon.

Lors de cette étude deux microscopes électroniques à balayage ont été utilisés. Dans les deux cas la visualisation est réalisée à partir des électrons secondaires qui permettent un accès à la topographie de surface

Dans un premier temps un MEB « **JSM S410 LV Scanning microscope JEOL** » a été utilisé afin d'acquérir les images. Pour cela les échantillons de cuirs ont été découpés en fines lamelles d'environ 1mm de largeur et disposés sur une pastille de carbone elle-même fixée sur une pastille en aluminium. La surface des échantillons a ainsi pu être observée à différents grossissements (x35, x75 et x200) sous une pression partielle de 20Pa avec une énergie du filament de 20KeV. Les images ont été traitées grâce au logiciel « **Semafore** ».

Pour chaque cuir, une observation de la face fleur, de la face chair et de la tranche a été effectuée.

Dans un second temps un MEB modèle **LEICA S430i** a été utilisé. Les échantillons découpés sous forme circulaire, ont été placés sous cloche une journée avant la réalisation de l'analyse puis sont collés sur un plot en aluminium grâce à un scotch carbone. Une métallisation à l'or est réalisée avant toute observation grâce au métalliseur **Polaron SC502** de chez **FISONS** Instrument. Le temps de métallisation a été adapté aux échantillons – 2 x 30s. L'énergie du filament a également été adaptée au type d'échantillon (environ 15KeV) et l'acquisition réalisée sous vide. Les images ont été acquises et traitées grâce au logiciel « **Leo UIF** ».

## V. MOUILLABILITE ET ANGLE DE CONTACT

La mesure d'angle de contact traduit la capacité d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. Lorsque la goutte est déposée sur une surface solide, 3 tensions de surface entrent en jeu et déterminent la forme de la goutte : la tension solide – vapeur, la tension solide – liquide et liquide – vapeur. Dans le cas où la goutte ne s'étale pas, le bord de la goutte va former avec son support un angle dit « angle de contact ». La valeur de cet angle, compris entre 0 et 180° est dépendante des valeurs des trois tensions de surface (**Figure 47**). L'équilibre mécanique de ces 3 forces est lié à l'équation de Young permettant de déterminer l'angle de contact:  $\sigma_{sv} = \sigma_{sl} + \sigma_{lv} \cos(\theta)$ .

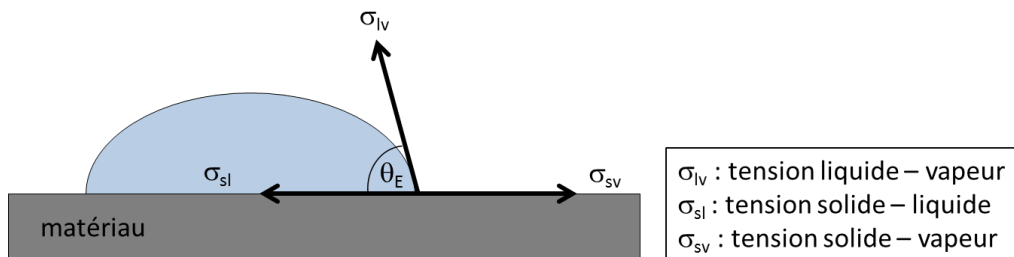


Figure 47 : Représentation des 3 tensions de surface s'exerçant à l'interface goutte / support.

Le mouillage peut être :

- Partiel : la goutte ne s'étale pas, l'angle formé par la goutte est compris entre 0 et 180°. Cette situation est observable dans le cas où la tension solide – vapeur < tensions (solide – liquide + liquide – vapeur)
- Complet / total : la goutte s'étale complètement à la surface du solide dans ce cas l'angle de contact est nul et le liquide va former un film de mouillage couvrant complètement la surface. Cette situation est observable dans le cas où la tension solide – vapeur est suffisamment élevée et thermodynamiquement favorable afin d'être remplacée par une interface solide liquide et une interface liquide vapeur.

Dans le cas où le liquide utilisé est de l'eau cette technique permet de déterminer le caractère hydrophobe (angle de contact supérieur à 90°, faible énergie de surface) ou hydrophile (angle de contact inférieur à 90°, énergie de surface importante) de la surface (**Figure 48**).

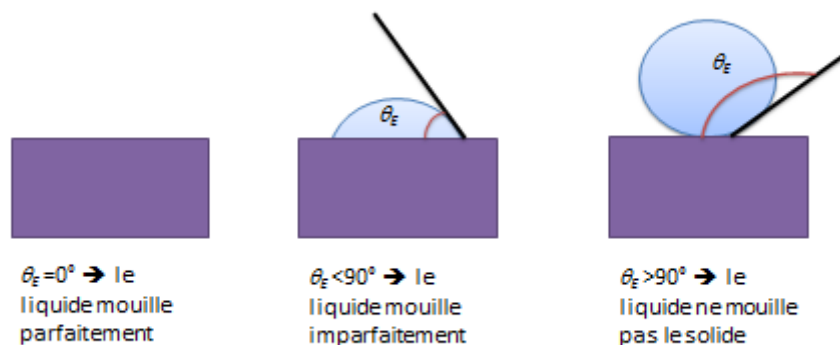


Figure 48 : Détermination du caractère hydrophile / hydrophobe par mesure de l'angle de contact.

*Dans le cas d'utilisation de liquide de références autres que l'eau, l'énergie libre de surface peut être déduite.*

*La mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait permet d'obtenir des renseignements concernant la non-homogénéité physique c'est-à-dire la rugosité de la surface.*

Les mesures sont réalisées en mode statique (support fixe) ou dynamique (support rotatif passant de 0 à 90°) grâce à un goniomètre **Drope Shape Analysis System DSA 10Mk2**. Les informations sont traitées grâce au logiciel « **Drope Shape Analysis** ». Une goutte de 15µL d'eau distillée est déposée sur l'échantillon. Une caméra enregistre à différents temps le comportement de la goutte vis-à-vis du support (angle de contact) et la cinétique de mouvement de la goutte d'eau.

## VI. GONFLEMENT DANS L'EAU - CAPACITE D'HYDRATATION

*Les capacités d'absorption d'eau sont mesurées par immersion des échantillons dans de l'eau. Les variations de masse au cours du temps sont quantifiées.*

*Cette technique devrait permettre d'évaluer la capacité d'absorption d'eau des cuirs avant et après exposition à la chaleur et/ou traitement enzymatique.*

Les échantillons de cuir sont préalablement pesés, puis totalement immergés dans de l'eau déionisée. Les échantillons sont pesés toutes les heures jusqu'à atteinte de l'équilibre et les variations de masse des échantillons observées.

## VII. SPECTROSCOPIE INFRA ROUGE

*La spectroscopie infrarouge (IR) permet d'obtenir des spectres d'absorption révélateurs de « l'empreinte » d'une molécule comportant des liaisons de type covalentes. Elle permet également de détecter au sein de la molécule la présence de groupements fonctionnels connus (Biémont 2008).*

*Outre l'identification de groupements présents au sein de la matière étudiée, plusieurs zones caractéristiques du spectre peuvent être identifiées :*

*Les bandes amides I et II permettent notamment d'obtenir des informations sur les structures secondaires des protéines*

*- La bande amide I : elle correspond aux vibrations d'élongation du groupement C=O ( $\nu_{C=O}$ )*

*- La bande amide II : elle correspond aux vibrations des groupements N-H de type « bending » /pliage ( $\delta_{NH}$ )*

*Dans le cas d'objets du patrimoine de type parchemin ou cuir, l'infrarouge permet d'obtenir des informations concernant l'état d'altération des cuirs :*

- $A_I/A_{II}$  : Le ratio du nombre d'onde entre l'amide I et II donne des informations concernant le degré d'hydrolyse du collagène*
- $\Delta\nu = \nu_1 - \nu_2$  : l'écart de nombre d'onde entre l'amide I et II donne des informations sur l'état de dénaturation de la chaîne polypeptidique (Plavan et al. 2010).*

Les spectres infrarouges ont été réalisés en mode ATR –diamant grâce à un spectromètre « **FTIR-ATR  $\alpha$  P Bruker** » utilisant un détecteur DTGS et des fenêtres de type KBr. Tous les spectres ont été réalisés entre 4000 et 600 $\text{cm}^{-1}$ . La résolution spectrale est de 2 $\text{cm}^{-1}$ . Chaque spectre résulte de la combinaison de 32 balayages, 5 spectres sont réalisés par échantillon et ils sont traités avec le logiciel « **OPUS** ».

Les variations des spectres entre cuir avant et après vieillissement ainsi que les bandes caractéristiques amides I et II sont analysées.

## VIII. MESURE DU PH DE L'EXTRAIT AQUEUX D'UN CUIR.

*Afin de déterminer si l'exposition des cuirs à la chaleur provoque une acidification des cuirs le pH de l'extrait aqueux des cuirs a été mesuré selon une adaptation de la norme française homologuée NF G52-214 juillet 1976, CUIRS ET PEAUX : analyse chimique du cuir, mesure du pH de l'extrait aqueux d'un cuir.*

Pour cela 1g  $\pm$  0,1g de cuirs sont immergés dans 20 mL d'eau déionisée à une température de 20°C  $\pm$  2°C jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (soit environ 48 heures). Le pH des solutions est mesuré après décantation.

Si le pH est supérieur à 4,5, le cuir ne possède pas d'acidité nuisible.

Si le pH est inférieur à 3,5, le cuir possède une acidité excessive et nuisible.

## IX. TABLE CHAUFFANTE

Cette technique a été réalisée au sein du laboratoire ICPI (Leather and Footwear Research Institute - Roumanie) dans le cadre d'une collaboration, avec l'aide de Ciprian Chelaru.

*La technique de la table chauffante (MHT) permet la détermination de la température de dénaturation de fibres de cuir corrélé à la température de dénaturation du collagène. Réalisée en présence d'eau en excès afin de mieux isoler les fibres et faciliter leur détérioration (Badea et al. 2008), cette technique permet d'obtenir des informations sur la stabilité hydrothermique des cuirs et peut être corrélée avec leur état de détérioration (René Larsen 2000; Chahine 2013). Le phénomène de dénaturation des fibres est un phénomène irréversible associé à la rupture des liaisons hydrogène du collagène (R. Larsen, Vest, et Nielsen 1993).*

*Le phénomène de dénaturation est dissocié en cinq étapes : les étapes A1 / B1 et B2 / A2 correspondant à la contraction de fibres individuelles et l'étape C, dynamique et rapide, correspondant à la contraction de l'ensemble des fibres, comme illustré dans **Figure 49**. La température associée à l'étape C correspond à la température de dénaturation des fibres de cuir.*

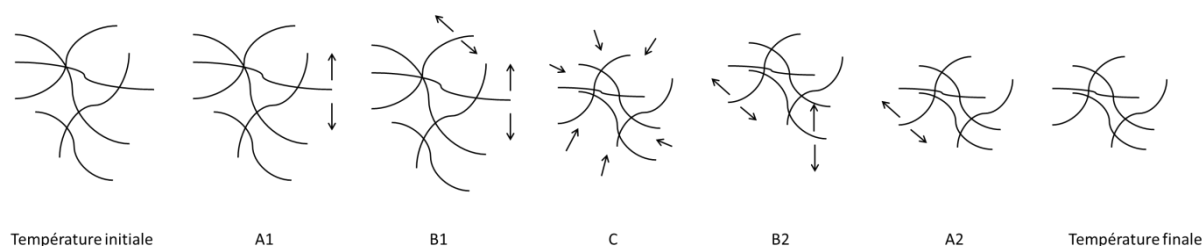


Figure 49 : Schéma illustrant les différentes étapes de contraction des fibres lors de l'analyse par table chauffante.

Une dizaine de fibres sont prélevées à l'aide de pinces au sein de la face chair d'un échantillon de cuir. Elles sont ensuite placées dans le creux d'une lame de microscope concave puis immergées dans de l'eau dégazée. Une lamelle est déposée sur la lame en veillant à remplir totalement (sans bulle d'air) la partie concave. La lame est ensuite disposée sur la plaque chauffante. La vitesse de chauffe est de 2°C/min. Une acquisition de l'image est réalisée toutes les 3 secondes. Un opérateur détermine à partir des images les températures auxquelles ont lieu les différentes étapes de dénaturation des fibres.

La technique de la table chauffante est voisine de deux autres techniques : la calorimétrie différentielle à balayage réalisée en excès d'eau et la méthode Juliani device. La première méthode est réalisée sur un échantillon de quelques milligrammes (environ 5mg) scellé dans une capsule en aluminium hermétique saturée en eau. L'analyse est réalisée entre 25 et 120°C et permet la détermination de la température de dénaturation de l'échantillon. Les valeurs obtenues par MHT et DSC ne diffèrent que de quelques degrés (environ 3°C). La technique Juliani device consiste à déterminer la température de dénaturation hydrothermale à l'échelle du matériau dans son ensemble elle est réalisée sur une éprouvette de cuir (0,5 x 5 cm) immergée dans de l'eau mise à chauffer.

L'ensemble de ces techniques ont été réalisées au sein du laboratoire ICPI.

## X. ANALYSE THERMO-GRAVIMETRIQUE (TGA)

*L'analyse thermogravimétrique permet de mesurer les variations de masse d'un échantillon, à l'aide d'une thermo-balance, lorsqu'il est exposé à une température dans une atmosphère contrôlée inerte (argon, azote) ou oxydante (dioxygène). Cette technique permet de déterminer entre autre la teneur en eau des échantillons mais également les températures de dégradation de l'échantillon, attribuables à des variations de masses, ainsi que les pourcentages de perte de masse. Dans certains cas elle peut également permettre de déterminer la part de composés organiques et inorganiques au sein du matériau*

Les mesures ont été réalisées sous argon à l'aide d'un thermogravimètre **TA instrument Q50**. Lors de cette expérience, réalisée sous flux d'argon, une nacelle en platine est utilisée. Un échantillon de cuir d'une masse comprise entre 5 et 20 mg est placé sur la nacelle préalablement tarée. Les variations de masse sont étudiées entre 25 et 800°C avec un gradient de température de 10°C/minute. Les données obtenues sont traitées avec le logiciel « **TA** ».

Ces mesures ont été réalisées au sein du laboratoire du LPPI (UCP), avec l'aide du Docteur Layla BEOUCH.

## XI. CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE (DSC) : DETERMINATION DES TEMPERATURES DE TRANSITION DE PHASES

Lors de la chauffe ou d'un refroidissement, toute transformation est accompagnée d'un échange de chaleur. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permet de mesurer les variations de flux thermiques émis ou reçus par un échantillon placé dans une atmosphère contrôlée subissant une rampe de température et de déterminer les températures correspondantes aux transitions de phases. Des informations d'ordre qualitatif et quantitatif peuvent être obtenues sur les transformations physiques et chimiques à l'origine des échanges de chaleur endothermique ou exothermique. En DSC l'énergie requise pour maintenir l'échantillon et la référence à la même température est mesurée en fonction de la température. Les phénomènes présentés en figure ci-dessous peuvent être observés (**Figure 50**).

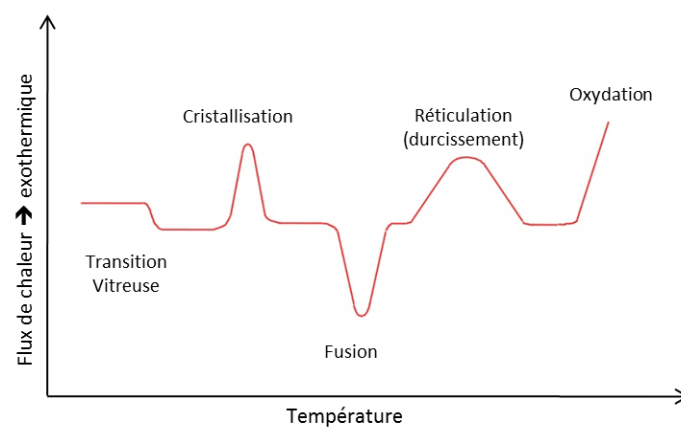


Figure 50 : Thermogramme illustrant les différentes transitions de phase observables au cours de la chauffe d'un matériau.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre « **TA instrument Q100** » et les résultats traités par le logiciel « **TA** ». Le calorimètre a été calibré au préalable pour la température et le flux de chaleur sur la gamme de températures d'intérêt avec de l'indium (point de fusion de l'indium : 156,6°C).

Pour chaque type de cuir, 1 échantillon non saturé en eau a été pesé (environ 3 mg) et scellé hermétiquement dans une capsule en aluminium. Une capsule vide a été utilisée comme référence. Les deux capsules (l'échantillon et la référence) ont été chauffées séparément avec un gradient de température de 10°C/min entre 20°C et 280°C, sous flux d'argon. L'appareil enregistre la quantité de chaleur devant être appliquée pour maintenir les deux capsules à la même température. Lorsque l'échantillon testé subit un processus endothermique, l'apport d'énergie nécessaire pour maintenir la température génère sur le thermogramme, l'apparition d'un pic dont la position du sommet indique la température à laquelle a lieu l'évènement/la transition de phase.

Ces mesures ont été réalisées au sein du laboratoire LPPI (UCP), avec l'aide du Docteur Layla BEOUCH.



## XII. ANALYSE THERMO-DIFFERENTIELLE (ATD)

*Le principe général de l'analyse ATD est le même que celui de la DSC. Cette technique permet l'étude des variations énergétiques au cours de la chauffe d'un échantillon. Cette technique a été utilisée en complément de la DSC car elle permet une étude sur une gamme de température plus élevée et en cinétique.*

La mesure est réalisée grâce au calorimètre (DSC/ATD/ATG) **NETZSCH STA449 F1**. Le matériau, d'une masse initiale comprise entre 10 et 20mg, est découpé en petits morceaux puis placé dans un creuset en alumine ouvert pour l'analyse. La mesure est réalisée sous flux d'azote entre 25 et 400°C à une vitesse de chauffe de 10°C/min. Les variations énergétiques sont enregistrées au cours de l'analyse grâce au **logiciel STA**.

Les mesures de variation de masse et d'énergie au cours de l'exposition à la chaleur ont été étudiées par TGA/ATD. Dans un premier temps, l'échantillon a été chauffé entre 25 et 160°C à une vitesse de chauffe de 10°C/min, puis la température a été maintenue fixe pendant 4 jours à 160°C. Les variations d'énergie et de masse ont été enregistrées observées au cours de la mesure.

Ces mesures ont été réalisées au sein du laboratoire du L2MGC (UCP), avec l'aide d'Annelise COUSTURE.

## XIII. EXTRACTION PROTEIQUE - SOLUBILISATION SEQUENTIELLE

*Le matériau est immergé dans des bains successifs de plus en plus dénaturants afin d'extraire séquentiellement des protéines ou des agrégats protéiques. L'ensemble des solutions utilisées ainsi que leur action respective sur notre échantillon sont détaillées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 6**).*

<i>Solution utilisée</i>	<i>Action</i>
<i>Eau</i>	<i>Extraction des protéines solubles dans l'eau (exemple l'albumine)</i>
<i>Solution saline (10% NaCl)</i>	<i>Extraction des protéines solubles en solution saline (exemple les globulines)</i>
<i>Solution alcoolique (70% d'éthanol)</i>	<p><i>Extraction des protéines solubles dans l'éthanol (exemple : les gliadines, protéines possédant des ponts disulfure).</i></p> <p><i>L'éthanol est un solvant organique miscible à l'eau possédant la propriété de précipiter les protéines à froid ainsi que de dénaturer les protéines de façon irréversible à température ambiante.</i></p> <p><i>Eventuellement extraction des polyphénols (tannins)</i></p>
<i>Solution dénaturante et réductrice (8M urée + 2% (V/V) <math>\beta</math>-mercaptoéthanol)</i>	<p><i>L'urée est un agent dénaturant chaotrope participant à la rupture des liaisons de faible énergie de type hydrogène, provoquant un dépliement de la structure des protéines ainsi qu'une perte de la structure tridimensionnelle.</i></p> <p><i>Le <math>\beta</math>-mercaptoéthanol est un agent réducteur permettant de rompre les ponts disulfures, essentiels pour le repliement de la protéine.</i></p>
<i>Solution de potasse caustique (0,1% KOH)</i>	<i>L'hydroxyde de potassium est un composé très basique, il va modifier la charge globale des protéines. Un agent fortement alcalin va également dénaturer les protéines notamment par rupture des liaisons hydrogène.</i>

Tableau 6 : Action des différentes solutions utilisées lors de l'extraction séquentielle des protéines.

*Cette technique devrait permettre d'extraire des protéines du cuir notamment certaines protéines connues, présentes dans la peau tel que le collagène, la fibronectine.*

Les échantillons ont été découpés en carrés de 2 cm de côté et ajustés de façon à obtenir des échantillons d'environ 40mg.

L'échantillon est immergé séquentiellement dans 10 mL des solutions listées ci-dessous, à température ambiante, sous une agitation à 50 rotations par minute. Dans le cas d'échantillon de plus petite taille, le rapport 40mg/10mL sera respecté.

- 1- Eau distillée pendant 8 heures.
- 2- Solution à 10% NaCl durant 1 nuit.
- 3- Solution à 70% éthanol pendant 7 heures et 30 minutes.
- 4- Solution à 8M urée contenant 2% de  $\beta$  mercaptoéthanol pendant 24 heures.
- 5- Solution à 0,1% KOH pendant 48 heures.

A la fin de chaque étape, la solution obtenue est recueillie et constitue une des fractions de l'extraction protéique. L'échantillon de cuir est ensuite placé dans la solution suivante sans rinçage préalable (**Figure 51**).

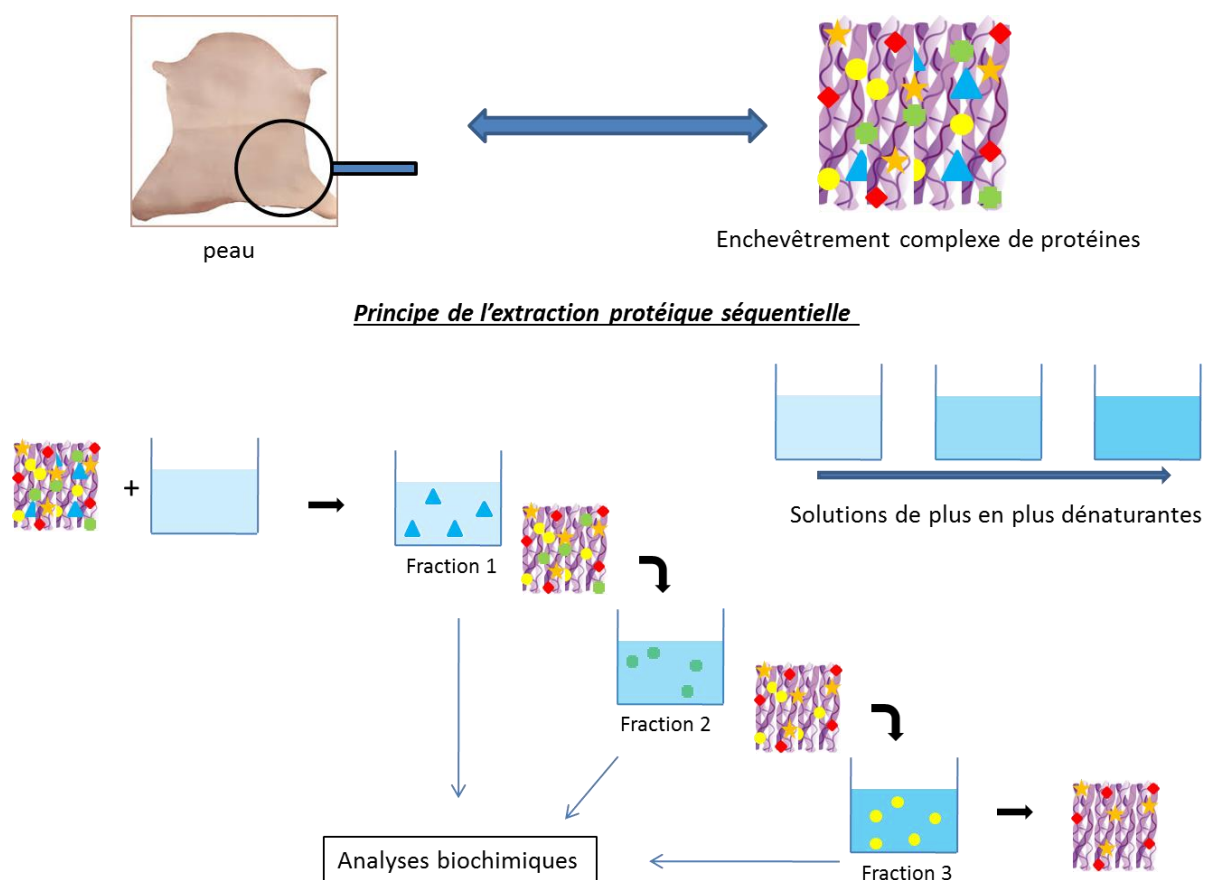


Figure 51 : Illustration du protocole d'extraction protéique séquentielle.

Les échantillons extraits dans l'urée sont dialysés en bains d'urée de concentrations décroissantes avant analyse. Pour cela, 1mL de la solution d'extraction protéique contenant 8M urée + 2%  $\beta$ -mercaptoéthanol sont placés au sein d'une membrane ester cellulose dotée de pores de **8-10KD Spectra/Por® Float A Lyzer® G2**. L'échantillon est dialysé contre 200mL d'urée 6M, puis 4M urée, puis 2M urée, puis dans l'eau. La dialyse a été réalisée sous agitation et au froid (10°C). Les solutions de dialyses ont été changées toutes les 12 heures.

#### XIV. DOSAGE DES PEPTIDES ET PROTEINES PAR LA METHODE DE FIELDS

La molécule de TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique) permet une quantification des groupements amines libres. En effet, la molécule réagit avec les groupements amines primaires aboutissant à la formation d'un produit chromophore présentant un pic d'absorption à 420nm. Il permet de doser les  $\text{NH}_2$  et par conséquent déterminer la concentration en protéines extraites du cuir et donc contenues dans chacune des solutions d'extraction.

Un volume d'échantillon est prélevé, puis additionné d'un même volume de tampon borate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (0.1M) dans NaOH (0.1M) pH 9.5). Un volume  $V_1$  est alors obtenu. Les deux solutions sont mises en contact pendant 30 minutes avant l'ajout d'un volume de  $V_1/10$  de TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) préalablement dilué au  $1/5^e$ . Après 5 minutes exactement la réaction qui a lieu à pH alcalin et à température ambiante est arrêtée par ajout de  $3V_1$  de tampon d'arrêt (3% de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (0.1M) + 97% de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.1M)). La densité optique de chaque fraction est ensuite mesurée à 420nm.

Préalablement au dosage, afin de s'affranchir de la présence des tannins qui interfèrent avec le TNBS, les différentes fractions ont été passées sur Centricon®. Le seuil de coupure utilisé est de 10kDa, seul la fraction retenu est conservée et diluée dans 1mL d'eau déionisée avant réalisation du dosage.

## XV. WESTERN BLOT

*Le Western Blot se décompose en deux parties distinctes. La première consiste à réaliser une électrophorèse sur gel d'acrylamide permettant une séparation de l'ensemble des protéines (présentes au sein des solutions) selon leur poids moléculaire. L'expérience est réalisée en condition dénaturante grâce à la présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) et réductrice grâce à la présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le SDS est un agent dénaturant permettant le dépliement des protéines et conférant aux protéines une charge globale négative. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol quant à lui est un agent réducteur ayant la capacité de rompre les ponts disulfures. Grace à l'application d'un champ électrique les protéines vont migrer vers le pôle positif de l'électrode à travers le réseau d'acrylamide. La séparation des protéines se fait selon leur poids moléculaire, les protéines de petite taille migrant davantage que celles de grande taille.*

*La seconde partie du Western Blot consiste à réaliser un transfert sur membrane de nitrocellulose. L'identification d'une protéine d'intérêt est ensuite réalisée par une technique immunologique.*

*Cette technique devrait permettre de détecter la présence de protéines identifiées au sein des échantillons de cuirs avant et après exposition à la chaleur.*

Pour la réalisation d'un Western Blot, les gels SDS-PAGE ont été réalisés selon la méthode Laemmli (Annexe 3) et la détermination du poids moléculaire des protéines a été effectuée grâce à l'utilisation de marqueurs de poids moléculaires (**marqueurs all blue standards précision + de BioRad**). Pour réaliser les SDS-PAGE, les échantillons ont été mélangés avec du bleu de charge Laemmli (4X) en présence de  $\beta$  mercaptoethanol. Les échantillons obtenus suite à l'extraction protéique dans la solution à 70% d'éthanol ont été alourdis avec du bleu de charge supplémenté en glycérol (40%) afin d'éviter que ces échantillons ne sortent des puits. Les gels de 1,5mm d'épaisseur contiennent 10% d'acrylamide. Une intensité constante de 30mA par gel est appliquée pour la migration.

Le témoin utilisé est de la fibronectine plasmatique humaine purifiée au laboratoire ERRMECe à partir de cryoprécipité de plasma sanguin. Par la suite les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (**Amersham**) grâce à l'application d'une tension constante de 110V pendant 1 heure à 10°C sous agitation. Une fois le transfert effectué, les membranes sont placées pendant 3 heures dans une solution de saturation (5% lait T-TBS), puis en présence de l'anticorps primaire (F3648 – Sigma Aldrich- produit chez le lapin) sous agitation à 8°C pendant une nuit, et enfin

mis en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline (A3687 – Sigma Aldrich) pendant environ 3 heures.

Les protéines d'intérêt, immuno-marquées, sont révélées grâce au **kit AP Color de BioRad**®. Les membranes ont été scannées sur **GS-800 BioRad** et les résultats traités avec le logiciel **Quantity One BioRad**.

## XVI. RHEOLOGIE

*La rhéologie peut être présentée comme la science permettant l'étude de l'écoulement et de la déformation d'un matériau soumis à un cisaillement. Cette méthode permet d'obtenir des informations sur les propriétés viscoélastiques d'un matériau. Elle est couramment utilisée lors de l'étude de matériaux de type gel. En effet, tout matériau qu'il soit à l'état liquide, visqueux, pâteux ou solide va présenter des propriétés viscoélastiques et d'écoulement. En effet, tout matériau présente :*

- *Des propriétés élastiques. Sous l'effet d'une contrainte le matériau qui peut être assimilé à un ressort, va se déformer immédiatement et emmagasiner de l'énergie. Lorsque la contrainte n'est plus soumise, un régime transitoire apparaît. Au cours de cette phase l'énergie emmagasinée est restituée. La structure va alors pouvoir reprendre une forme proche de celle initiale. Plus l'organisation du matériau est complexe, plus le réarrangement des molécules interne au matériau sera lent.*
- *Des propriétés visqueuses. Lorsqu'une matière à des propriétés visqueuses, elle possède la capacité de s'écouler, seule différera la vitesse d'écoulement qui peut être très rapide, de l'ordre de quelques secondes dans le cas d'un liquide soumis à la pesanteur, voire de l'ordre de plusieurs siècle comme observé dans le cas des vitraux en verre. Plus le matériau sera visqueux, moins il s'écoulera.*

*Lors de l'étude des propriétés du matériau, l'échantillon est situé entre deux surfaces planes dont une seule réalise des mouvements de rotation. Sous l'effet de ce cisaillement, l'échantillon va s'écouler en couches planes, parallèles les unes aux autres. La vitesse d'écoulement des couches est plus rapide au niveau de la surface mobile puis décroît jusqu'à atteindre 0 au niveau de la surface fixe (cf **Figure 52**).*

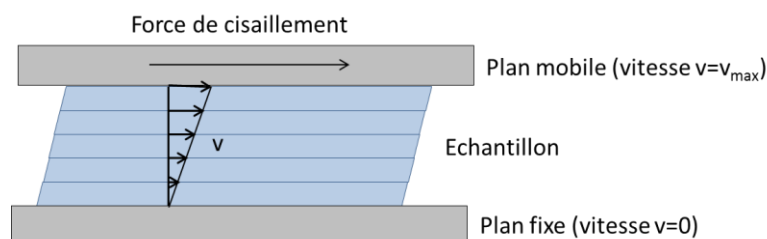


Figure 52 : Représentation schématique de la variation de la vitesse d'écoulement en fonction des différentes couches d'un matériau.

*Lors de l'application du cisaillement deux grandeurs sont mesurables :*

- *La contrainte de cisaillement ( $\sigma$ ), exprimée en Pa, elle correspond à la force appliquée de façon parallèle ou tangentielle par unité de surface*
- *La vitesse de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ), exprimée en  $s^{-1}$ , elle correspond à la variation de vitesse à laquelle les couches se déplacent l'une par rapport à l'autre. Cette grandeur décrit le cisaillement que subit le matériau.*

*Dans le cas de notre étude, cette technique peu commune pour l'étude de tels matériaux a été utilisée. Une analyse dynamique est réalisée, dans ce cas le mouvement de cisaillement appliqué est oscillatoire et périodique. La fréquence oscillatoire est notée  $\omega$*

*Dans notre cas deux grandeurs seront identifiées :*

- *$G'$ , module de stockage, caractérise la densité et la rigidité du réseau*
- *$G''$ , module de perte, caractérise la mobilité.*

*Cette technique devrait permettre d'obtenir des informations complémentaires à celles obtenues par DMA.*

Les mesures ont été réalisées grâce à un rhéomètre **Anton Paar MCR301** en mode oscillatoire avec un système plan/plan rugueux de 25mm. Lors de l'acquisition un balayage de fréquences est réalisé entre 0,1 et 10Hz pour une déformation de 0,1%. La géométrie des échantillons est carrée pour permettre une mesure relative et la température du système est maintenue à 20°C à l'aide d'un système Peltier. Les données sont traitées grâce au **logiciel Rheo Plus**.

## XVII. ANALYSE MECANIQUE DYNAMIQUE (DMA) : BALAYAGE DE FREQUENCE ET DE TEMPS.

*La DMA (analyse mécanique dynamique) est une technique permettant de mesurer les propriétés mécaniques d'un matériau. Contrairement aux tests de traction classique, qui ne s'intéresse qu'à la composante élastique, la DMA permet d'avoir des informations tant concernant la partie de type « solide élastique » que « liquide visqueux » et par conséquent permet d'obtenir des informations sur les composantes inélastiques et visqueuses. Les tests les plus classiques en DMA sont réalisés selon une dynamique oscillatoire au cours de laquelle une tension (ou une contrainte) est appliquée au matériau de manière sinusoïdale et la contrainte (ou tension) résultante est mesurée. Différentes données peuvent ainsi être obtenues, caractéristique des propriétés viscoélastiques du matériau :*

- *Le module de conservation  $E'$  : il correspond à la composante élastique et est lié à la rigidité de l'échantillon.*
- *Le module de perte  $E''$  : il correspond à la composante visqueuse et par conséquent à la capacité du matériau à dissiper l'énergie mécanique par le mouvement moléculaire.*

*Cette méthode est la méthode principale utilisée pour définir les propriétés mécaniques des échantillons et quantifier les variations. Les variations de propriétés mécaniques entre échantillons dans un même état prélevés au sein de la peau, même au niveau de zones voisines sont très hétérogènes.*

Les mesures ont été réalisées grâce à un appareil **TA instrument Q800**.

Les acquisitions ont été réalisées pour une fréquence fixe de 1Hz et l'évolution des valeurs de module de conservation observée au cours du temps.

Pour l'ensemble des analyses réalisées les paramètres suivant ont été fixés :

- le mode tension a été utilisé
- Déformation / Contrainte (strain) : 0,05%
- Pré-tension (Preload force) : 0,01N
- « Force track » 120%
- Température ambiante - aucune source de refroidissement (flux d'azote pouvant assécher les échantillons) n'a été utilisée.
- La géométrie des échantillons testés est rectangulaire
- Les dimensions (largeur et épaisseur) des échantillons renseignés lors de l'acquisition représentent une moyenne de 4 mesures effectuées dans le sens de la largeur et de 6 mesures dans le cas de l'épaisseur.

Les données obtenues sont traitées avec le **logiciel « TA Universal Analysis »**.

Les mesures en cinétique ont été réalisées à une fréquence fixe de 1Hz sur différents temps et à différentes températures en fonction de l'expérience réalisée :

- dans le cas de l'étude des conséquences de l'exposition à la chaleur, l'échantillon est chauffé de 25 à 160°C puis maintenu à cette température pendant 3 jours et 8 heures.
- dans le cas de l'étude de l'effet du traitement, la mesure est réalisée à température ambiante et pendant 3 jours (dans le cas de l'échantillon témoin, la mesure a été réalisée sur 12 heures).

Les mesures ont été réalisées au sein du LPPI (UCP) et avec l'aide du Docteur Cédric VANCAEYZEELE.

Pour une meilleures comparaison, les valeurs obtenues en rhéologie et DMA ont été normalisées, avec comme valeur, cuir brut=1.

## XVIII. TESTS STATISTIQUES

Les tests statiques ont été réalisés selon le modèle du test de Student, test statistique permettant de comparer les valeurs de deux groupes d'échantillons indépendants, sur un minimum de trois échantillons ou trois moyennes (N=3). Les résultats sont considérés comme significativement différents dès lors qu'une étoile est observée, avec :

- $p < 0,05$  : \*
- $p < 0,01$  : \*\*
- $p < 0,001$  : \*\*\*

## **PARTIE 3 : STRATEGIE DE RESTAURATION PAR VOIE ENZYMATIQUE**

### **A. supports de restauration enzymatique**

#### **I. SOLUTION ENZYMATIQUE**

*Les essais de restauration en solution aqueuses ont été entrepris afin de montrer si l'apport d'une enzyme en solution peut contrecarrer les effets néfastes de l'eau sur les cuirs.*

Pour le traitement en solution : la collagénase est utilisée. Des solutions à 1U et 10U.mL<sup>-1</sup> (avec 1U=1  $\mu$ mole de substrat transformé par minute) sont préparées dans de l'eau déionisée ou dans un tampon HEPES 50mM, pH 8. Les échantillons de cuir (1,5 cm x 1,5 cm) préalablement pesés sont immergés dans 2mL de solution enzymatique dans une plaque P24 (**Thermo**) et maintenus à 37°C pendant 24 heures.

Au bout de 24 heures, les échantillons sont légèrement épongés afin d'ôter l'excédent de liquide et pesés.

#### **II. GEL POLYSACCHARIDIQUE ENZYMATIQUE**

*La formation d'un réseau protéique ou polysaccharidique sous forme de gel permet l'immobilisation de l'eau au sein du réseau. L'utilisation de gel (polysaccharidique) permet une délivrance contrôlée des molécules présentes au sein de la phase aqueuse. Dans le cas de notre étude une protéase thermostable a été incluse au sein d'un gel d'agar. D'autre part l'utilisation d'un gel déposé au contact de l'échantillon permet d'éviter toute immersion au sein de la phase aqueuse.*

Une solution de thermolysine (**Sigma**) est préparée en présence de 20 mM de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) dans un tampon HEPES 50 mM pH 8 ou dans l'eau et conservée à 37°C. Une solution d'agar (**Bacto Agar, Difco**) est préparée à chaud et additionnée de la solution enzymatique ( $V_{\text{final}}/10$ ) lorsque sa température atteint 70°C. Le gel à 0,5% (P/V) en agar et 10 U.mL<sup>-1</sup> en thermolysine est coulé dans des boîtes de Pétri carrées (12 x12cm – 0,5 cm d'épaisseur) et refroidi à température ambiante.

Les échantillons de cuirs à tester sont pesés, mesurés puis disposés à la surface du gel, face fleur coté gel et incubés à 37°C pendant 24 heures. Deux échantillons de cuir sont disposés sur un même gel, un brut et un chauffé. Le rapport surface échantillon / gel est de 1/93.

Au bout de 24 heures, les échantillons sont essuyés puis pesés, mesurés et mis à sécher sous un poids afin de limiter les phénomènes de courbure.



### III. ESSAI DE RESTAURATION DES CUIRS PAR APPLICATION D'UN GEL PROTEIQUE ENZYMATIQUE

Dans le cas de notre étude la dégradation progressive du réseau de gel induit un relargage des molécules contenues dans le gel y compris de l'enzyme elle-même.

Deux types de gels enzymatiques, formés à partir de gélatine (5%*m/V*), ont été réalisés. Ils diffèrent par la structure de leur réseau solide. Les protéases incluses au sein du gel sont la collagénase, métalloprotéase spécifique du collagène ou l'espérase<sup>®</sup>, sérine protéase aspécifique, toutes deux en très faible concentration (respectivement  $5 \times 10^{-5}$  U/mL et  $1,1 \times 10^{-3}$  U/mL).

Le premier type de gel est constitué d'un gel de gélatine incluant une protéase (collagénase ou espérase). Il est formé à température ambiante, puis placé à 4°C avant application sur les échantillons dans le but de favoriser la formation de triples hélices. Le gel ainsi obtenu, lié uniquement par des liaisons de faible énergie est dit physique. Il reste stable jusqu'à une température de l'ordre de 30°C, au-delà de laquelle il se re-solubilise.

Le second type de gel contient de plus une enzyme de type liante : la transglutaminase ( $TG^{ase}$ ). La présence de cette enzyme permet la formation de liaisons iso-peptidiques entre les chaînes latérales des résidus lysine et glutamine de la gélatine. Un gel chimique, matrice de gélatine réticulée (liaisons covalentes) incluant la protéase (collagénase ou espérase) est obtenu. Ce gel est formé à 37°C, puis placé à 4°C avant application sur échantillons. Lors du passage au froid, un faible taux d'hélices est formé. Ce gel n'est pas réversible à la température. La figure ci-dessous présente les différents types de gels pouvant être obtenus (**Figure 53**).

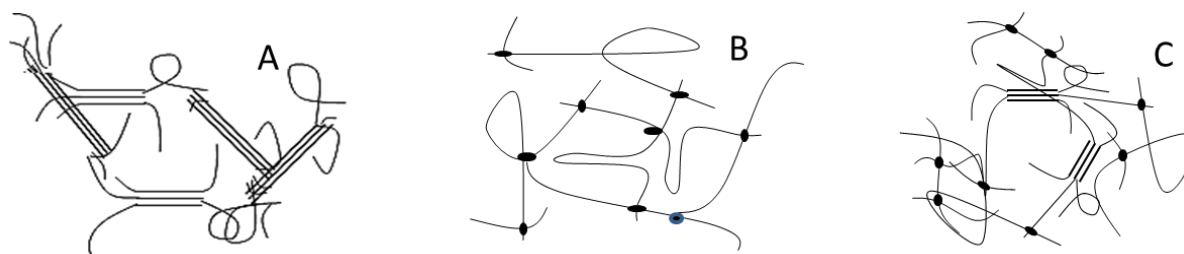


Figure 53 : Gel de gélatine obtenu à (A)  $T < 30^{\circ}\text{C}$  en absence de transglutaminase : liaisons hydrogène = gel physique, (B)  $T > 30^{\circ}\text{C}$  en présence de transglutaminase : liaisons covalentes = gel chimique, (C)  $T > 30^{\circ}\text{C}$  en présence de transglutaminase, puis placé à  $T < 30^{\circ}\text{C}$  : liaisons covalentes + triple hélices = gel chimique – physique.

Ce type de support devrait permettre une action de l'enzyme tout en limitant le contact entre le cuir et la phase aqueuse.

Quatre types de gels de gélatine (5%*m/V* – Gélatine de peau de porc, Type A, **Sigma G2500**) ont été formés (gélatine seule, gélatine + protéase ; gélatine +  $TG^{ase}$ , gélatine +  $TG^{ase}$  + protéase) par immersion de la gélatine en poudre dans de l'eau déionisée à 40°C. Avant que les gels ne soient coulés dans des petites boîtes de pétri de diamètre 5,5 cm, les différentes enzymes sont ajoutées à la solution de gélatine.

La concentration finale de transglutaminase attendue est de 1U/mL, le rapport Volume TGase/Volume final ne doit pas dépasser  $1/5^e$ . Pour cela une solution intermédiaire de TGase à une concentration de 5U/mL est préparée.

Les concentrations finales attendues de collagénase et d'Espérase® sont de respectivement  $5 \cdot 10^{-5}$  U/mL et  $1,1 \cdot 10^{-3}\%$ .

Ces différents gels sont des « enzels » de 48 heures c'est-à-dire qu'ils ne seront plus dans un état de gels après 48 heures d'incubation à 37°C, ils seront liquéfiés sous l'action de l'enzyme.

L'application de gels de gélatine+protéase à lieu à température ambiante, ces gels n'étant pas stable à la température. Les gels de gélatine contenant de la transglutaminase et des protéases est stable à la température, il sera appliqué à 37 °C et à température ambiante pendant 24 heures.

#### IV. ESSAI DE RESTAURATION DES CUIRS PAR APPLICATION D'UNE SOLUTION AQUEUSE CONTENANT UN CO-SOLVANT : LE GLYCEROL

*Le glycérol est un co-solvant hydrosoluble dépresseur d'activité thermodynamique de l'eau. Il permettra de limiter les interactions entre l'eau libre, en diminuant sa part, et nos échantillons. Notre enzyme sera introduite dans la phase aqueuse.*

Des échantillons de cuirs mimosa bruts et chauffés sont découpés à l'emporte-pièce (diamètre 1,4cm) et pesés.

Des solutions contenant 1M, 2,5M, 10M glycérol sans (témoin) et avec  $150 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  d'Espérase® sont préparées dans l'eau. L'activité spécifique de l'enzyme utilisée est  $1500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Les échantillons de cuirs sont disposés au fond d'un puits de plaque P24 et incubés dans 2 mL de solution pendant 24 heures à 37°C, puis essuyés, pesés et caractérisés.

#### V. ESSAI DE RESTAURATION DES CUIRS PAR APPLICATION D'UNE EMULSION ENZYMATIQUE

*Une émulsion constitue un mélange homogène de deux liquides non miscibles. Elle repose sur la formation de micelles :*

- Directes dans le cas d'une émulsion de type huile dans eau
- Inverses dans le cas d'une émulsion de type eau dans huile

*Dans le cas de notre étude il est attendu :*

- Que l'enzyme soit introduite dans la phase aqueuse
- Que l'émulsion permette d'apporter un certain pourcentage d'eau dans une conformation non dommageable pour le cuir chauffé.

Les émulsions enzymatiques sont réalisées par mélange extemporanément à raison de  $150 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  d'une enzyme aspécifique, l'Espérase® à une émulsion réalisée à façon par l'entreprise TRIMADEL, spécialisée dans les produits d'entretien des cuirs.

## B. Test d'activité protéolytique des enzymes

### I. MATRICES MODELES

Les molécules de gélatine sont capables de former des gels thermosensibles dits physiques. Lorsque la solution de gélatine est préparée (à une température proche de 40°C), les chaînes de gélatine possèdent une conformation de pelote aléatoire (random coil). Lors du refroidissement de cette solution, si la température est inférieure à 30°C et la concentration en gélatine (m/V) supérieure à 0,5%, les chaînes de gélatine vont changer progressivement de conformation et vont former localement des triples hélices dans les zones riches en proline et hydroxyproline. Le gel ainsi obtenu est dit physique. L'eau fait partie intégrale du réseau formé (Papon, Leblond, et Meijer 2007).

Dans le cas de l'augmentation de la température le réseau sera sous forme de gel jusqu'à ce que la température de transition hélice/pelote aléatoire soit atteinte ; dans ce cas le gel redevient solution.

Le gel physique ainsi obtenu est ensuite placé dans différentes solutions possédant un pouvoir réticulant :

- solution de glutaraldéhyde : le mécanisme de réticulation se fait entre les groupements aldéhydiques du glutaraldéhyde qui possèdent la capacité de fixer les groupements amine (Speer et al. 1980) notamment au niveau des glycines.
- solution de tannins : le mécanisme de réticulation se fait via les quinones des tannins.

Ces différentes matrices réticulées ont été utilisées dans le but d'une compréhension des mécanismes impliqués lors de la réalisation de traitements enzymatiques.

#### I.1. MATRICE MODELE GELATINE - GLUTARALDEHYDE

Des gels contenant 5% de gélatine de porc (m/v) ont été formés à 4°C pendant 2 heures au sein d'une boîte de Pétri. Les gels sont ensuite démoulés et puis immergés dans une solution contenant 1.5% de glutaraldéhyde(**Sigma G400, 25%**) pendant la nuit. Les gels sont ensuite rincés 3 fois à l'eau milliQ puis placés dans une solution de glycine à 1% pendant 8h.

#### I.2. MATRICE MODELE GELATINE – TANNINS

Des gels contenant 5% de gélatine de porc (m/v) ont été formés à 4°C pendant 2 heures au sein d'une boîte de Pétri. Les gels sont ensuite démoulés et immergés pendant 24 heures dans une solution contenant 10%(m/V) de poudre tannante au mimosa.

### II. TEST D'INACTIVITE DE L'ENZYME AU CONTACT DES TANNINS

Dans le but de savoir si la protéase espérase est inactivée en présence de tannins, elle est incubée avec une solution de tannins concentrée sur son activité protéolytique est testée sur un gel de gélatine.

Une solution d'espérase à une concentration de 150U/mL est préparée. Le volume est de 2 mL. A cette solution est ajouté 500 µL d'une solution de tannin à 10% et l'ensemble est laissé incubé à

température ambiante pendant 2 heures. La concentration en tannins choisie n'est pas trop élevée pour éviter tout « tannage » du gel de gélatine.

Après deux heures d'incubation la solution espérase + tannins est déposé sur un gel de gélatine (5% m/V) et la cinétique d'hydrolyse du gel par l'enzyme étudiée.

### III. TEST D'ACTIVITE SUR UN PARCHEMIN

Cette expérience permet de tester l'activité de la protéase sur un matériau confectionné tout comme le cuir à partir d'une peau. Les protéines du parchemin se trouvent dans une conformation relativement proche de celle d'un cuir dans le sens où elles ne sont pas réticulées par les tannins, seul les tannins utilisés lors du tannage de la peau sont ajouté dans le cas d'un cuir.

Cette expérience devrait nous permettre de savoir si l'inaction de l'enzyme est due à la formation de complexe protéine-tannins.

Un échantillon de parchemin de diamètre 1cm a été immergé dans une solution aqueuse enzymatique d'espérase préparée à une concentration de 150U/mL par mélange de l'enzyme dans de l'eau. Un contrôle témoin est réalisé par immersion d'un échantillon de parchemin dans de l'eau non additionnée d'enzyme.

## Résultats et discussions

De nature accidentelle, naturelle, volontaire, l'exposition à la chaleur, lors d'incendie est particulièrement dévastatrice. Dans le cadre de notre étude l'attention s'est portée sur le cuir fréquemment utilisé dans les objets du patrimoine et plus particulièrement pour les reliures.

Différents degrés d'altération des cuirs peuvent être recensés et seront dépendants de facteurs tels que la distance au foyer, du contact avec l'eau et également de l'étendue de la zone de contact. Les dommages engendrés par la chaleur s'ajoutent à ceux préexistants qui peuvent être d'ordre physique, chimique ou biochimique.

L'exposition à la chaleur induit des modifications visibles à l'échelle macroscopique, principalement un brunissement, une rétraction et une rigidification et rendent très souvent ces objets fragiles et non manipulables. De nos jours, aucune stratégie de restauration systématique n'est développée et les cuirs endommagés par la chaleur sont souvent conservés en l'état voire éliminés comme dans le cas de la couverture des reliures qui sont remplacées par un cuir neuf.

Peu d'études recensent et quantifient les effets de la chaleur en tant que telle et aucune n'a analysé les modifications induites à différentes échelles structurales sur un même cuir.

Les conservateurs et restaurateurs ont exprimé leur souhait de nouvelles approches de restauration permettant de conserver ces cuirs ayant subi une exposition à la chaleur. C'est pourquoi une recherche a été mise en place dont la finalité était de développer un nouveau traitement de restauration. Pour cela il était nécessaire de mieux appréhender les effets de la chaleur sur le matériau.

Les objectifs de la recherche étaient les suivants :

- Définir les paramètres d'exposition à la chaleur permettant de reproduire visuellement les effets d'un incendie
- Caractériser et quantifier les effets d'une exposition à une chaleur sèche à différentes échelles structurales par diverses approches d'analyses physico-chimiques et biochimiques.
- Proposer un support de traitement de restauration utilisant des molécules biologiques (enzymes).

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets de la chaleur sur des cuirs de fabrication parfaitement connue, proche des procédés employés historiquement. Notre démarche consiste à mesurer sur un même échantillon les modifications de propriétés induites par différentes conditions d'exposition à la chaleur (temps et température d'exposition variables). Deux types de cuirs, l'un de tannage mimosa (tannins condensés), l'autre de tannage sumac (tannins hydrolysables) ont été étudiés. Les résultats étant concordants, nous ne présenterons que les résultats obtenus dans le cas des cuirs mimosa. L'impact du temps et de la température d'exposition à la chaleur sera examiné et discuté. L'ensemble des approches analytiques retenues (physiques, chimiques, biochimiques) permettront d'appréhender les effets de la chaleur à différentes échelles structurales (macroscopique, microscopique, moléculaire).

La deuxième partie de cette étude consiste à concevoir une stratégie de restauration par voie enzymatique et à tester différents types de supports pour les biocatalyseurs.






## Préambule : choix des conditions d'exposition à la chaleur

Le but de notre étude est d'analyser par diverses méthodes les modifications observées sur un cuir exposé à la chaleur sans contact avec de l'eau.

Les transformations morphologiques observées après exposition à la chaleur se traduisent par une modification de son aspect avec un changement de sa couleur (brunissement) et de ses dimensions. Une modification des propriétés mécaniques traduites par une augmentation de la rigidité est également observée

Dans le cadre de cette étude, il a été nécessaire de préparer des échantillons de référence, soumis à des conditions d'expositions à la chaleur contrôlées qui nous permettent d'établir des comparaisons. Ce protocole a pour but de reproduire en laboratoire les conditions d'exposition à haute température sans contact direct avec une flamme ou l'eau. L'utilisation de matériaux modèles permet de s'affranchir des variations existantes entre des échantillons anciens tant au niveau de leur histoire (vieillesse, altérations physiques, chimiques, biologiques différents) qu'au niveau de l'hétérogénéité du matériau. Les conditions d'exposition à la chaleur choisies doivent être reproductibles et applicables à une quantité suffisante de cuir pour obtenir des échantillons relativement homogènes afin de mener à bien notre étude.

Une première série d'essais a été réalisée avec un cuir commercial (cuir de veau, tannage végétal de type inconnu, couleur havane, acheté chez RELMA- Paris), découpé en carrés de 2,5cm de côté, posés sur une plaque d'enfournement en céramique et exposés pendant 5 minutes à des températures comprises entre 200 et 300°C cf **Figure 54**.

					
Température Temps 5 minutes	Cuir témoin non exposé à la chaleur	200°C	255°C	265-270°C	300°C
Pourcentage de perte de masse		13,1%	13,1%	15,0%	27,0%

*Figure 54 : Echantillons exposés à une chaleur sèche à différentes températures et pourcentage de perte de masse.*

Après exposition pendant 5 minutes à 200°C, peu de variations d'aspect sont observées. L'échantillon reste sensiblement plan, sa rigidité semble augmentée et un léger brunissement est observable. Une augmentation de la température à 255°C engendre des modifications substantielles et hétérogènes sur la surface. Le pourtour de l'échantillon est carbonisé et il a perdu sa planéité, se recroquevillant. Après exposition pendant 5 minutes à 265-270°C, une partie importante de l'échantillon est carbonisée, essentiellement sur le pourtour. Ces deux résultats considérés ensemble mettent en évidence un phénomène de diffusion de la chaleur depuis la périphérie de l'échantillon vers le centre, engendrant une hétérogénéité des effets de la chaleur dans l'ensemble du volume. Dans le cas d'une exposition à la chaleur pendant 5 minutes à 300°C, l'échantillon est complètement carbonisé, boursoufflé et semble avoir fondu.

Dans le cas d'une dégradation de type carbonisation aucune restauration n'est envisageable. Ces résultats préliminaires montrent qu'une exposition à la chaleur, même très courte, engendre des variations importantes d'aspect des cuirs selon la température.

Par ailleurs, l'exposition à la chaleur, même sur une courte durée s'accompagne d'une perte de masse qui augmente de manière non linéaire avec la température d'exposition. On observe une perte de 13% de la masse après 5 minutes à 200°C ou 255°C, cette perte augmente de 10% lorsque la température est portée à 265°C et double (27%) à 300°C. Une partie de cette variation massique est attribuable à la déshydratation de l'échantillon. Pour les températures les plus hautes, d'autres constituants sont responsables de la perte de masse en particulier les produits volatils de dégradation du collagène et des acides aminés tels que l'ammoniac ou le dioxyde de carbone (Bowes et Taylor 1970; Chahine 2013).

La même expérience réalisée avec un échantillon de grande taille a abouti à une carbonisation complète de l'échantillon après seulement 2 minutes et 30 secondes à 255°C

Afin d'éviter ces phénomènes de diffusion de chaleur et d'obtenir des échantillons altérés de façon homogène et de grande taille pour notre étude, de nouvelles conditions d'exposition à la chaleur doivent être appliquées. Le temps d'exposition doit être augmenté pour permettre une diffusion de la chaleur homogène au sein du matériau et d'autre part, la température doit être diminuée afin d'éviter les phénomènes de carbonisation.

On trouve peu de publications sur l'effet de l'exposition des cuirs à la chaleur en tant que telle. La chaleur est couramment utilisée comme moyen de « vieillissement artificiel » car elle accélère la vitesse des réactions chimiques (thermo-oxydation dans le cas d'une chaleur sèche, hydrolyse dans le cas d'une chaleur humide) (Chahine 2013).

Les travaux réalisées dans le cadre du projet européen STEP LEATHER PROJECT « protection and Conservation of European Culturage Heritage », (1991-1994), proposent de nombreuses techniques de vieillissement artificiel, dépendantes des paramètres choisis (température, humidité relative, pollution, radiation...). Parmi les conditions testées en chaleur sèche, les cuirs étaient exposés 1, 2 ou 4 jours à 150°C. A partir de ces conditions de référence, nous avons choisi le temps d'exposition le plus long, soit 4 jours, et trois températures ont été appliquées : 150°C, 160°C et 170°C.

Une caractérisation visuelle rapide (loupe binoculaire et MEB) des échantillons chauffés a mis en évidence des variations notables d'apparences des cuirs selon les conditions de chauffage cf **Figure 55**.



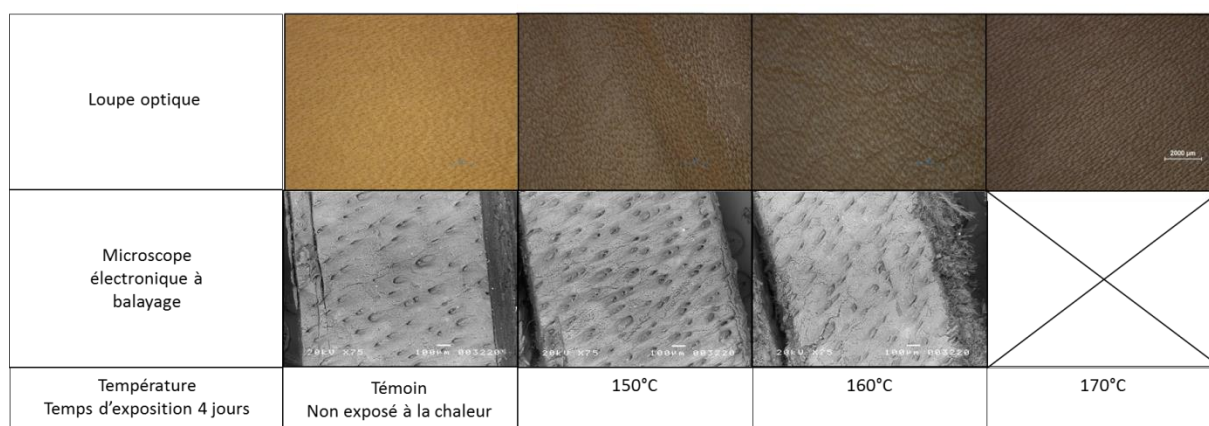


Figure 55 : Apparence de la surface fleur d'échantillons de cuir brut ou exposé à la chaleur 4 jours à 150, 160 ou 170°C. La couleur des échantillons n'est pas normalisée.

Après exposition à la chaleur, l'observation macroscopique des échantillons révèle un aspect homogène sur l'ensemble de leur surface, sans carbonisation en périphérie. Cette exposition entraîne un brunissement du cuir, qui s'accroît avec la température, une rétraction de l'échantillon entier (diminution dimensionnelles) et une diminution de la taille des pores (40µm en moyenne dans le cas du cuir témoin ; 36µm en moyenne dans le cas des cuirs chauffés). Ces échantillons sont plus rigides.

A partir de ces observations de variations morphologiques et colorimétriques ainsi que de l'évaluation des propriétés mécaniques au toucher, une condition intermédiaire soit la température de 160°C pendant 4 jours a été retenue.

Afin de distinguer l'effet de la température de celui de la durée de l'exposition, deux conditions complémentaires ont été testées :

- 4 jours à 100°C, qui permet d'examiner l'impact de la température en conservant une durée identique. Le choix de la température correspond à celle d'évaporation de l'eau.
- 25 heures à 160°C, qui permet d'examiner l'impact de la durée en conservant une température identique. La durée, proche d'une journée, a été déterminée par une mesure cinétique en continu qui sera détaillée plus loin (§ Résultats Partie 1-C-II.).

Considérés ensemble, ces résultats mettent en évidence un effet de la température et du temps d'exposition primordiaux dans le cas de la dégradation du cuir. Une température très élevée pendant un temps court est plus dévastatrice qu'une chaleur plus modérée appliquée sur un temps long. Ce phénomène est à prendre en considération pour une meilleure compréhension des résultats à venir.

L'objectif de notre étude est de comprendre les conséquences de l'exposition d'un cuir à une chaleur sèche et de caractériser les modifications qui s'opèrent à différentes échelles structurales.

## **PARTIE 1 : CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES DES CHANGEMENTS ENGENDRES SUR LES CUIRS PAR L'EXPOSITION A LA CHALEUR**

La caractérisation des effets de l'exposition à la chaleur a été entreprise par diverses méthodes d'analyse physico-chimiques et biochimiques. Trois conditions d'exposition à la chaleur ont été retenues : 4 jours à 100°C ; 25 heures à 160°C et 4 jours à 160°C. Ces conditions ont été appliquées sur différents types de cuirs (cuir de tannage mimosa et sumac) ; seuls les résultats obtenus dans le cas d'un cuir de tannage au mimosa (CM) seront présentés. L'analogie ou la différence avec les cuirs de tannage sumac sera mentionnée.

Ces différentes techniques d'analyses nous ont permis d'appréhender et de quantifier les modifications morphologiques (d'aspect) et structurales qui s'opèrent ainsi que leurs conséquences au niveau du cuir : changements de couleurs, de dimensions, de rigidité...


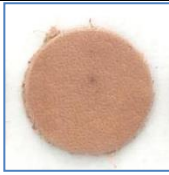
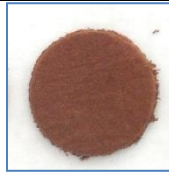
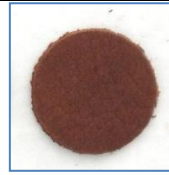
Dans un premier temps, les variations globales d'aspect, de morphologie et de relation à l'eau seront abordées. Dans un second temps les modifications structurales seront présentées et enfin les conséquences de ces modifications sur la souplesse des cuirs seront quantifiées.

### **A. Variations globales d'aspect, de morphologie et relation à l'eau**

Suite à l'exposition à la chaleur, différentes propriétés ont été examinées à l'échelle macroscopique : les variations de couleur, dimensionnelles, morphologiques et de surface.

#### **I. VARIATIONS COLORIMETRIQUES**

Les variations colorimétriques des échantillons ont été étudiées par mesures des valeurs  $L^*a^*b^*$  et la différence de couleur  $\Delta E$  calculée. Les valeurs obtenues dans le cas des différents échantillons sont présentés en **Tableau 7**.

Composante	CM brut	CM 4 jours 100°C	CM 25 heures 160°C	CM 4 jours 160°C
				
L*(clarté)	64,63	57,8	37,86	33,52
a*(vert → rouge)	8,23	12,15	14,28	14,36
b*(bleu → jaune)	15,52	18,31	16,75	15,73
$\Delta E$ CM brut /	0	8,33	27,4	31,6

*Tableau 7 : Valeurs L\*a\*b\* mesurées sur des cuirs mimosa brut (CM brut) et exposés à la chaleur dans différentes conditions : 4 jours à 100°C (CM 4 jours 100°C) ; 25 heures à 160°C (CM 25 heures 160°C) et 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C). Les valeurs de différences de couleur ( $\Delta E$ ) sont calculées entre l'échantillon de cuir brut et ceux exposés à la chaleur.*

L'exposition à la chaleur induit un brunissement des échantillons. La valeur de  $\Delta E$ , qui traduit la différence de couleur entre l'échantillon de cuir brut et chauffé, varie de 8 à 32. Un écart de couleur supérieur à 5 est perceptible à l'œil nu (Mokrzycki W. S 2011). Dans notre cas, quelles que soient les conditions d'exposition à la chaleur, la différence est visuellement perceptible. Après un chauffage de 4 jours à 100°C, le  $\Delta E$  est proche de 5. En revanche, pour les expositions à la chaleur de 25 heures et 4 jours à 160°C, les valeurs de  $\Delta E$  sont très supérieures à 5. Il peut être conclu que la température a des effets plus importants que la durée de l'exposition, mais ces phénomènes s'additionnent.

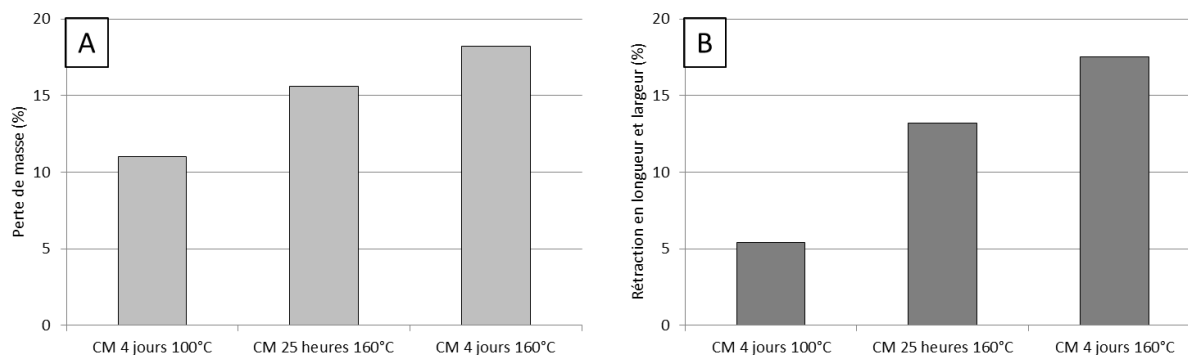
L'analyse des coordonnées L\*a\*b\* indique pour l'ensemble des conditions étudiées, une réduction de la clarté/luminance symbolisée par la diminution des valeurs L\* ainsi qu'un rougissement caractérisé par l'augmentation des valeurs a\*. Les variations observées dans le cas du rougissement et de la clarté/luminance sont dépendantes des conditions d'exposition à la chaleur, comme observées précédemment. Une des hypothèses qui peut être formulée concernant le phénomène de brunissement des cuirs lors de l'exposition à la chaleur serait attribuable à la réaction de Maillard. Ce processus également appelé brunissement non enzymatique repose sur l'interaction de sucres réducteurs et d'acides aminés (Machiels et Istasse 2002). Dans le cas d'un cuir, la réaction peut avoir lieu si le matériau est déshydraté. Dans ce cas, les groupements sont proches et peuvent réagir facilement. Ce mécanisme est favorisé à haute température et pH acide. Dans le cas d'un cuir, les composants tels que les GAGs et plus particulièrement l'AH possèdent une structure analogue aux carbohydrates (sucres) et offrent une source de sucre réducteur pouvant interagir avec les molécules de collagène (Covington et Covington 2009). La réaction de Maillard induit un phénomène de réticulation (crosslinking) des protéines (Nagaraj, Shipanova, et Faust 1996). La seconde hypothèse repose sur la détérioration des tannins à l'origine d'un rougissement des cuirs (R. Larsen 1992).

Dans le cas des cuirs de tannage au sumac chauffés 4 jours à 160°C, des effets qualitativement similaires ont été mesurés. Nous pouvons en déduire que le brunissement des cuirs au cours de l'exposition à la chaleur n'est pas liée au type de tannin utilisé.

## II. VARIATIONS MASSIQUES ET DIMENSIONNELLES

Outre des variations de couleur, l'exposition à la chaleur provoque sur les cuirs une perte de masse et une rétraction observables à l'échelle macroscopique. Dépendantes des conditions d'exposition à la chaleur, elles sont analysées par pesée et mesures de taille des échantillons avant et après exposition à la chaleur.

Les variations massiques et dimensionnelles sont présentées dans la figure ci-dessous (**Figure 56**).



*Figure 56 : Pourcentage de perte de masse [A] et de variation dimensionnelle [B] des cuirs suite à l'exposition à la chaleur.*

Quelles que soient les conditions d'exposition à la chaleur, une perte de masse comprise entre 11 et 18% de la masse initiale est observée. La perte de masse est plus importante lorsque l'échantillon est chauffé pendant 25 heures à 160°C (-15%) que pendant 4 jours à 100°C (-11%). Si le chauffage à 160°C est prolongé de 25 heures à 4 jours, une perte de masse additionnelle est observée ; l'équilibre n'est donc pas atteint après 25 heures à 160°C.

On peut remarquer que les valeurs sont du même ordre de grandeur que celles mesurées pour un chauffage court de 5 minutes à une température plus élevée (jusque 270°C – cf § préambule). Une analyse plus détaillée de la cinétique de perte massique sera réalisée afin de déterminer quels phénomènes se succèdent lors du chauffage (cf § PARTIE 1 : B.III).

Quelles que soient les conditions d'exposition à la chaleur, une diminution des cotes des échantillons est observée traduisant une rétraction du matériau. Le phénomène est du même ordre de grandeur en longueur et en largeur indiquant que l'orientation de la peau n'a pas d'impact sur cette rétraction. Ce résultat est en accord avec l'orientation diverse des feuillet de fibrilles présents au sein de la peau (Voet et Voet 2005).

Les rétractions observées sont supérieures pour les échantillons chauffés 25 heures à 160°C que pour ceux chauffés 4 jours à 100°C. Celles observées à une température élevée sont plus importantes que celles causées par un temps long à une température inférieure. Un chauffage prolongé à 160°C entraîne une rétraction supplémentaire.

L'exposition à la chaleur induit également des variations au niveau de l'épaisseur du matériau. Les valeurs sont dépendantes des conditions. Dans le cas de l'exposition pendant 4 jours à 100°C, aucune variation de l'épaisseur n'est observée. Après 25 heures à 160°C l'épaisseur augmente d'environ 6% et de près de 30% après 4 jours.

L'effet additif de deux facteurs est calculé à l'aide de la relation :  $F_A + F_B (1 - F_A)$  où  $F_A$  et  $F_B$  représentent les effets des événements A et B respectivement. Si l'effet observé est supérieur à la

valeur obtenue par ce calcul, les effets de A et B sont considérés comme synergiques. Ici la formule d'additivité permet de calculer une valeur de 14,5% de rétraction qui est inférieure aux 17,5% mesurés. L'effet de la température sur la rétraction des cuirs est plus important que l'effet du temps, mais les deux phénomènes sont synergiques.

On suppose que la rétraction est étroitement corrélée avec la perte de masse en raison de l'évaporation de l'eau qui va provoquer un rapprochement des éléments constitutifs du matériau et une augmentation de la densité (Florian 2006) pouvant être à l'origine des variations de dimensions de l'échantillon. Les phénomènes de rétraction et déshydratation sont observables pour tous les échantillons. La perte de masse plus importante, corrélée avec la rétraction plus marquée après chauffage à 160°C, implique la présence de phénomènes d'altération s'ajoutant à celui de la déshydratation. Avant toute analyse complémentaire et en se basant sur la littérature, une décomposition du collagène et des acides aminés peut être attendue, accompagnée de la libération de certains composés volatils tels que l'ammoniac et le dioxyde de carbone (Bowes et Taylor 1970).

### III. VARIATIONS MORPHOLOGIQUES

Les modifications morphologiques à l'échelle microscopique ont été observées par microscopies optique (MO) et électronique à balayage (MEB) au niveau de la surface des cuirs ainsi que sur des fibres (MEB). Les résultats sont présentés **Figure 57**.

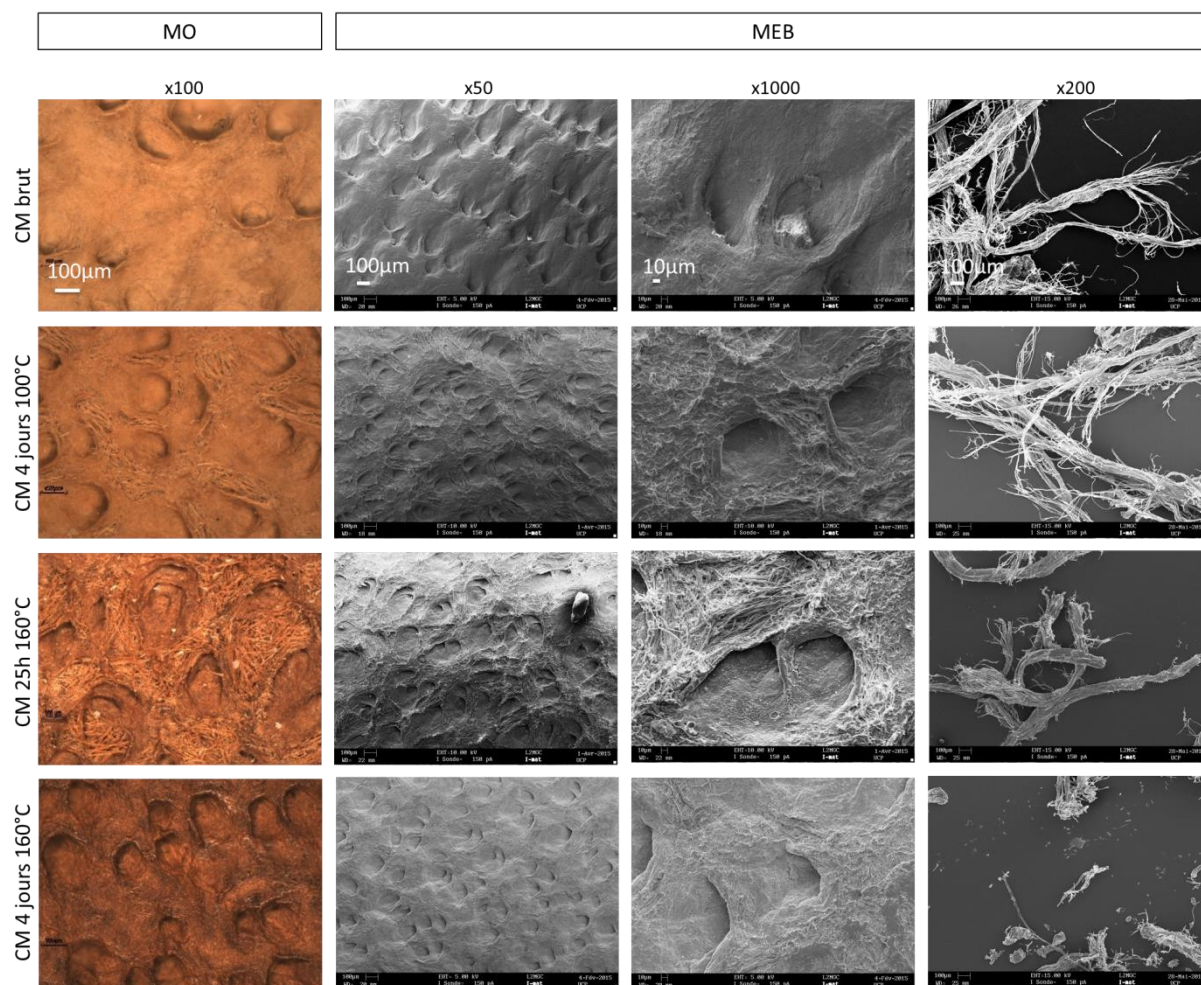


Figure 57 : Observations en microscopie optique (MO) en champs sombre (lumière rasante) et électronique à balayage (MEB) de la surface fleur des cuirs et des fibres.

Suite à l'exposition à la chaleur on peut distinguer deux types de morphologie. Le premier révèle la présence de fibres en surface, observables après chauffage 4 jours 100°C et 25 heures 160°C. Les fibres sont davantage visibles dans le cas d'un chauffage de 25 heures à 160°C. Dans le cas de l'échantillon exposé pendant 4 jours à 160°C, un autre type de morphologie est observable : la surface du cuir est comme fondue, le cuir semble s'être gélatinisé. D'après Kite et Thomson (Kite et Thomson 2006), l'exposition à une chaleur sèche provoque une rupture des fibres accompagnées d'une gélatinisation caractérisée par des fibres encollées, un échantillon rigide, rétracté et cassant. Nos observations le confirment.

Dans cette étude, le terme « gélatinisation » désignera un effondrement irréversible de la structure cristalline accompagné d'un aspect fondu (Blond et Le Meste 1988; Le Meste et Colas 1990).

La caractérisation des effets de la chaleur à l'échelle des fibres révèle des morphologies différentes en fonction des conditions d'exposition à la chaleur. Le tableau ci-dessous (**Tableau 8**) indique les variations de taille des fibres.

	CM brut	CM 4 jours 100°C	CM 25 heures 160°C	CM 4 jours 160°C
Longueur	5750±500µm	4750±825µm	3350±310µm	1050±300µm
Diamètre	110±30µm	85±30µm	100±30µm	100±30µm

*Tableau 8 : Variations de taille et de diamètre des fibres de cuirs prélevées à l'aide d'une pince pour l'observation au MEB dans le cas de cuirs brut (CM brut) ou chauffés (CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C, CM 4 jours 1660°C).*

Les fibres observées pour le cuir brut sont de grande taille et bien formées. Après exposition pendant 4 jours à 100°C, la longueur des fibres est peu modifiée mais elles semblent cependant moins cohésives. Après 25 heures à 160°C la taille des fibres est nettement diminuée; les fibres semblent former un ensemble compact gélatinisé. Ces effets sont plus prononcés encore dans le cas de l'exposition pendant 4 jours à 160°C.

Le phénomène de gélatinisation décrit précédemment (Kite et Thomson 2006) permet d'expliquer la morphologie beaucoup plus courte et comme fondue des fibres après exposition à 160°C. Les fibres sont encollées, rigides et cassantes, il est très probable que leurs propriétés viscoélastiques soient fortement modifiées après exposition à la chaleur, notamment due à l'oxydation qui provoque des scissions au niveau du collagène. Cette hypothèse sera vérifiée par des expériences ultérieures. La réduction de la taille des fibres, variable selon les conditions d'exposition à la chaleur, peut être corrélée avec les phénomènes de rétraction observés à une échelle macroscopique.

Comme observé sur l'ensemble de l'échantillon, l'effet de la température d'exposition, à l'échelle des fibres, est plus important que celui de la durée et ces effets sont additifs.

#### IV. IMPACT DE L'EXPOSITION A LA CHALEUR SUR LES PROPRIETES DE SURFACE ET DE MOUILLAGE

Les observations précédentes ont mis en évidence des variations morphologiques au niveau de la surface des échantillons après exposition à la chaleur. Les propriétés de surface ont été caractérisées par des mesures d'angles de contact et de mouillabilité.

Ces techniques permettent de rendre compte du caractère mouillable/non mouillable et hydrophile ( $\theta_E < 90^\circ$ )/hydrophobe ( $\theta_E > 90^\circ$ ) d'un échantillon. L'interaction entre une goutte d'eau de 15µL et la surface du cuir (face fleur) a été étudiée au cours du temps (jusqu'à 3 minutes) (cf **Figure 58**).



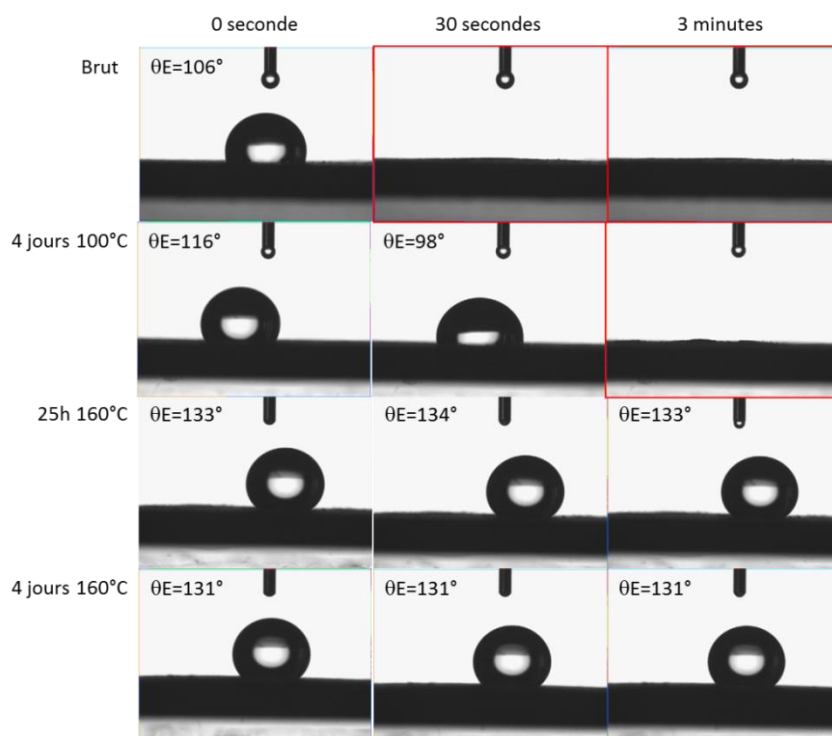


Figure 58 : Etude de l'interaction entre une goutte d'eau de 15µL et la surface (face fleur) du cuir.

La mesure de la mouillabilité sur cuir brut révèle une valeur d'angle de contact de 106°, indiquant une hydrophobie de surface. La goutte déposée en surface est rapidement absorbée par le cuir signe d'un caractère mouillable. Les cuirs de tannage végétal très hydrophiles par nature sont souvent rendus résistants à l'eau par application d'un corps gras en surface telle qu'un lubrifiant (Kite et Thomson 2006; Covington et Covington 2009).

Dans le cas de nos échantillons le caractère hydrophobe du cuir brut peut être attribuable à l'application d'huile (annexe protocole de fabrication). Afin de vérifier cette hypothèse, les cuirs ont été immergés dans une solution d'acétone afin d'ôter la couche de lubrifiant présent en surface. Les résultats obtenus ont mis en évidence un abaissement des valeurs d'angles de contact de 106 à 93°. En absence de couche de lubrifiant en surface, le cuir reste hydrophobe cependant les valeurs d'angles de contact sont diminuées, signe qu'une partie de l'hydrophobie de surface est attribuable à la présence du lubrifiant.

Après exposition pendant 4 jours à 100°C, l'augmentation de la valeur d'angle de contact à 116° indique que l'hydrophobie est légèrement augmentée. Par ailleurs, la cinétique de pénétration de la goutte au sein du matériau est ralentie ; mais le cuir reste mouillable car la goutte est absorbée au bout de trois minutes.

Le caractère mouillable de ces cuirs peut être induit par les caractéristiques poreuses de la surface.

Dans les cas des cuirs exposés à 160°C pendant 25 heures ou 4 jours des angles de contact élevés de l'ordre de 132° indiquent une hydrophobie plus prononcée que précédemment. De plus les cuirs ne sont plus mouillables pour des temps courts de 3 minutes.

Dans le cas des cuirs de tannage au sumac, des variations similaires sont observées. Le phénomène n'est pas dépendant du type de tannage effectué.



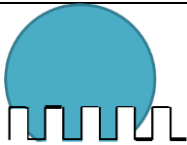
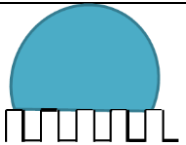
Il peut être conclu que la température de chauffage est un paramètre entraînant des modifications de polarité de surface et ce quel que soit le temps d'exposition à la chaleur. La suppression de la couche de lubrifiant par immersion des cuirs chauffés 4 jours à 160°C dans l'acétone permet d'abaisser les valeurs d'angles de contact de 132 à 110°. Il est donc possible que la présence d'un lubrifiant en surface des cuirs contribue de manière significative à l'augmentation de l'hydrophobie. Au vu de l'ensemble des résultats obtenus dans le cas des cuirs bruts et chauffés traités à l'acétone (respectivement 93° pour le cuir CM brut et 110° pour le cuir CM 4 jours 160°C), l'origine de l'augmentation d'hydrophobie de surface après exposition à la chaleur n'est pas uniquement due à la présence d'un lubrifiant en surface. Il est possible que l'altération des tannins et/ou de l'huile par la chaleur participe aux modifications des propriétés hydrophiles/hydrophobes des cuirs.

Au niveau protéique, l'exposition à la chaleur provoque une réorganisation des protéines aux différents niveaux de structures qui conduisent à la rupture des interactions de faible énergie. La protéine perd sa structure hélicoïdale puis se contracte. Les groupements apolaires initialement majoritairement enfouis au cœur de la protéine se trouvent exposés à la surface où leur caractère hydrophobe est exprimé. Cet état énergétique n'est pas stable et conduit à la formation d'interactions intermoléculaires entre protéines notamment au niveau des régions hydrophobes, conduisant à la formation d'agrégats protéiques (Davis et Williams 1998, Tornberg 2005). Ces modifications pourraient également être à l'origine des modifications de propriétés de surface.

La détermination de l'hystérésis de contact, par mesures d'angles de contact dynamiques, permet d'obtenir des informations complémentaires sur les origines du caractère (super)hydrophobe.

Sur une surface donnée, l'accrochage d'une goutte d'eau, par exemple sur une vitre, est due au phénomène d'hystérésis de l'angle de contact. En effet, dans ce cas, une différence de valeur entre l'angle à l'avancée et l'angle à la reculée, comprise entre 10° et 60° est observable dans la majeure partie des cas, comme ici pour les échantillons chauffés à 160°C. L'asymétrie d'angle de contact engendre une force capable de s'opposer au poids de la goutte. La présence de défauts physiques ou chimiques à la surface du matériau est à l'origine d'un tel phénomène (Quéré 2015).

Wenzel et Cassie ont les premiers mis en évidence que la micro-texture du support est à l'origine d'un renforcement de l'hydrophobie d'un matériau hydrophobe. Deux modèles ont été proposés cf **Tableau 9**.

Deux modèles de super- hydrophobies de surface		
	Wenzel	Cassie
Modèle proposé		
Explications	Le liquide épouse la surface du solide	« état fakir » : la goutte repose sur le sommet des aspérités
Rugosité	Peu élevée	Très élevée
Hystérésis attendue	Elevée – la goutte d’eau remplit les aspérités et microstructures du matériau et s’y accroche. L’angle de reculée observé est faible.	Faible (<10°) - la goutte repose à la fois sur la surface du matériau et sur de l’air. La présence de l’air va « gommer » les défauts de la surface
Conséquences	La goutte reste accrochée au support	Très faible adhésion de la goutte d’eau (perle et glisse) : effet lotus
L’augmentation et l’amplification de la rugosité de surface permet de passer d’un état de Wenzel à celui de Cassie		

*Tableau 9 : Comparaison des modèles de Wenzel et Cassie (Cassie et Baxter 1944 ; Bhushan, Jung, et Koch 2009 ; Quéré 2015).*

Les mesures dynamiques ont été réalisées dans les cas où la vitesse de pénétration de la goutte d’eau au sein du matériau était suffisamment lente. Seuls les cuirs chauffés à 160°C ont pu être étudiés, les autres cuirs, mouillables, absorbent trop rapidement la goutte d’eau. La figure ci-dessous (**Figure 59**) présente les résultats obtenus.


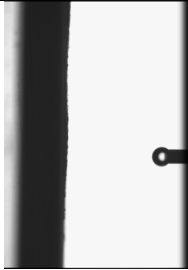
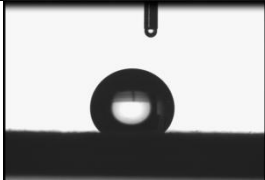

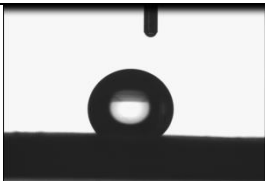

Type de cuir étudié	Support à 0° (horizontal)	Support à 90° (vertical)	Valeurs d'angles $\theta_E$
CM 4 jours 100°C			Goutte absorbée
CM 25 heures 160°C			$\theta_E$ arrière : 108,7° $\theta_E$ avant : 119,0°
CM 4 jours 160°C			$\theta_E$ arrière : 102,7° $\theta_E$ avant : 126,0°

Figure 59 : Mesures d'angles de contact dynamique réalisé entre 0° (support horizontal) et 90° (support vertical) dans le cas des cuirs chauffés.

Les résultats montrent que même placée à 90° (plan vertical) la goutte ne décroche pas du support et le liquide épouse la surface du solide dont la rugosité n'est pas très élevée au vu des images faites en surface des cuirs par MEB. L'ensemble de ces observations suggèrent que le modèle proposé par Wenzel s'applique dans le cas de notre étude.

Afin de déterminer si l'exposition à la chaleur a uniquement un impact sur l'hydrophilie ou l'hydrophobie de la surface ou sur l'ensemble du matériau, des mesures de capacités d'absorption d'eau ont été effectuées.

## V. IMPACT DE LA CHALEUR SUR LES CAPACITES D'ABSORPTION D'EAU

Les mesures de capacités d'absorption d'eau consistent à évaluer la variation de masse d'un échantillon immergé dans de l'eau jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. La capacité des échantillons à absorber de l'eau est alors évaluée pour l'ensemble du volume et exprimée en pourcentage d'absorption d'eau par rapport à la masse initiale. Les résultats sont présentés en **Figure 60**.

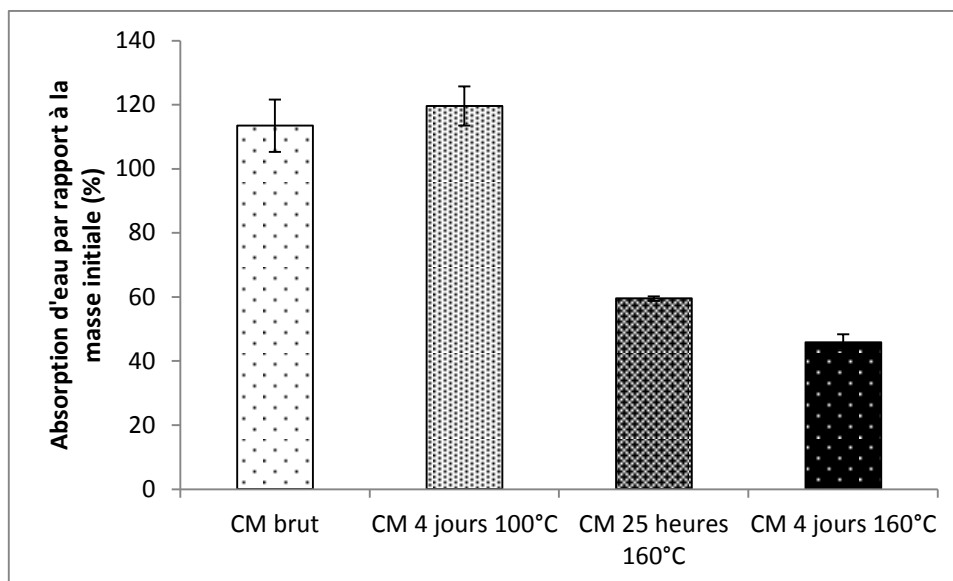


Figure 60 : Capacités d'absorption d'eau des échantillons de cuirs bruts et chauffés dans différentes conditions.

Les résultats obtenus dans le cas du cuir brut révèlent une absorption d'eau de l'ordre de 113% par rapport à sa masse initiale, soit plus de l'équivalent de sa masse en eau, doublant ainsi son poids. Cela bien que les mesures d'angle de contact aient révélé une surface légèrement hydrophobe sans doute due à la présence du lubrifiant en surface comme abordé précédemment. La valeur observée est en accord avec les faibles taux de gonflement observés lorsque de la peau de veau est hydratée : gain en épaisseur de l'ordre de 0,04mm après 24 heures d'immersion dans de l'eau distillée (Choman 1961). Des capacités de gonflement très élevées sont au contraire observées pour les dérivés du collagène peu structurés comme la gélatine réticulée par l'acide gallique qui atteint 15 à 20 fois sa masse (Yan et al. 2011). Ces capacités de gonflement sont cependant inférieures à celles observées dans le cas de gélatine non traitées, et diminuent en fonction du taux de réticulation (baisse de 8,59% et 15,89% pour des concentrations en acide gallique de 20 et 30mg/g de gélatine sèche respectivement) (Yan et al. 2011).

Dans le cas du cuir chauffé pendant 4 jours à 100°C, aucune différence significative n'est observée. Bien que ces cuirs présentent une légère augmentation de l'hydrophobie de surface ainsi qu'un léger ralentissement de la vitesse de mouillabilité, aucune diminution des capacités d'absorption d'eau n'a été observée.

Après un chauffage à 160°C, une diminution significative des capacités d'absorption d'eau du cuir est observée. L'absorption d'eau est de 59,5% après un chauffage de 25 heures et de 46% après une exposition de 4 jours. Ces résultats sont cohérents avec les mesures d'angle de contact qui montrent une augmentation de l'hydrophobie de surface et la perte de mouillabilité sur des temps courts. La modification importante des propriétés de surface peut limiter la pénétration de l'eau au sein du cuir.

Des résultats similaires sont obtenus pour les cuirs sumac, avec une diminution des capacités d'absorption d'eau passant de 109,5±12% dans le cas des cuirs brut à 37,4±14% dans le cas des cuirs chauffés 4 jours à 160°C. Ceci indique que le phénomène n'est pas dépendant du type de tannage effectué.

Il est possible que cette diminution soit due à une modification des interactions physico-chimiques des composés internes du cuir. Comme présenté précédemment, l'exposition à la chaleur provoque l'exposition des groupements hydrophobes des protéines, enfouis au cœur de la structure à l'état natif, et accélère la formation de complexes tannins-protéines. La formation de ces complexes, possible grâce à la présence de tannins libres, n'ayant pas réagi avec le collagène lors du processus de tannage, repose sur des interactions hydrophobes et hydrogène (Siebert, Troukhanova, et Lynn 1996). Ce phénomène est en accord avec la diminution de l'aptitude du cuir à s'associer à des molécules d'eau. Dès 1958, J.M. Cassel obtenait des résultats indiquant une diminution des capacités d'absorption d'eau du collagène après exposition à la chaleur. Selon l'auteur, ce phénomène serait la conséquence d'une perte considérable des groupements latéraux polaires par destruction ou condensation accompagnée d'une diminution de la surface/taille de l'échantillon (Cassel 1958).

### **Discussion et conclusion**

L'étude aux échelles macroscopique et microscopique des conséquences de l'exposition à la chaleur a révélé des modifications de l'aspect général des cuirs et de leur affinité à l'eau. A l'échelle macroscopique, des différences notables de coloration, de taille et de masse des échantillons ont été observées, elles se caractérisent par un brunissement et une rétraction des échantillons exposés à la chaleur. A ces observations, s'ajoute une rigidification perceptible au toucher. La réaction de Maillard, à l'origine du brunissement non enzymatique des échantillons pourrait participer à cette rigidification par la formation de liaisons covalentes.

Les observations de surface à une échelle microscopique ont mis en évidence une augmentation de la rugosité de surface ainsi qu'une gélatinisation des échantillons les plus fortement chauffés (4 jours à 160°C). La gélatinisation est décrite comme une disparition des structures cristallines du matériau et plus spécifiquement du collagène dans le cas du cuir.

Les mesures d'hystérésis de contact montrent que l'exposition à la chaleur rend le matériau super-hydrophobe et ces observations sont en concordance avec des modifications de la microstructure de surface selon le modèle de Wenzel. Les capacités d'absorption d'eau, révélatrices des propriétés de gonflement de l'ensemble du matériau diminuent de moitié après exposition à 160°C. Ces observations peuvent être corrélées à une dénaturation des protéines, augmentant l'hydrophobie et provoquant l'apparition d'agrégats protéiques, la perte de groupements polaires ainsi que la diminution de la surface (rétraction) comme mis en évidence par J.M. Cassel.

Des observations similaires ont été faites sur des cuirs préparés avec des tannins hydrolysables ou condensés et mettent en évidence un effet graduel et combiné de la température et du temps d'exposition, la chaleur ayant plus d'impact que la durée d'exposition.

Les mécanismes d'altération étudiés sont donc dépendants de la température et de la durée de l'exposition.

## B. effet de la chaleur au niveau moléculaire et protéique

L'objectif de cette partie est d'étudier les modifications intervenant au sein de la molécule de collagène et des composés associés dans le cuir. Pour cela nous examinerons la structure secondaire des protéines à partir de mesures en spectroscopie infrarouge puis seront étudiés les effets de la chaleur au niveau des structures cristallines et des constituants protéiques.

### I. IDENTIFICATION DES MECANISMES D'ALTERATION DES CUIRS

La spectroscopie infrarouge et plus particulièrement l'observation des bandes amides I et II permet d'accéder à la structure secondaire de la molécule de collagène. Par ailleurs, la position des pics caractéristiques des amides I et II permet d'évaluer les processus d'altérations qui sont intervenus.

Lors de notre étude, les caractérisations par infrarouge ont été réalisées sur la face fleur des échantillons, en mode ATR entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$ . Les résultats obtenus dans le cas des cuirs brut (CM brut) et chauffés (CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C, 4 jours 160°C) sont présentés en **Figure 61**.

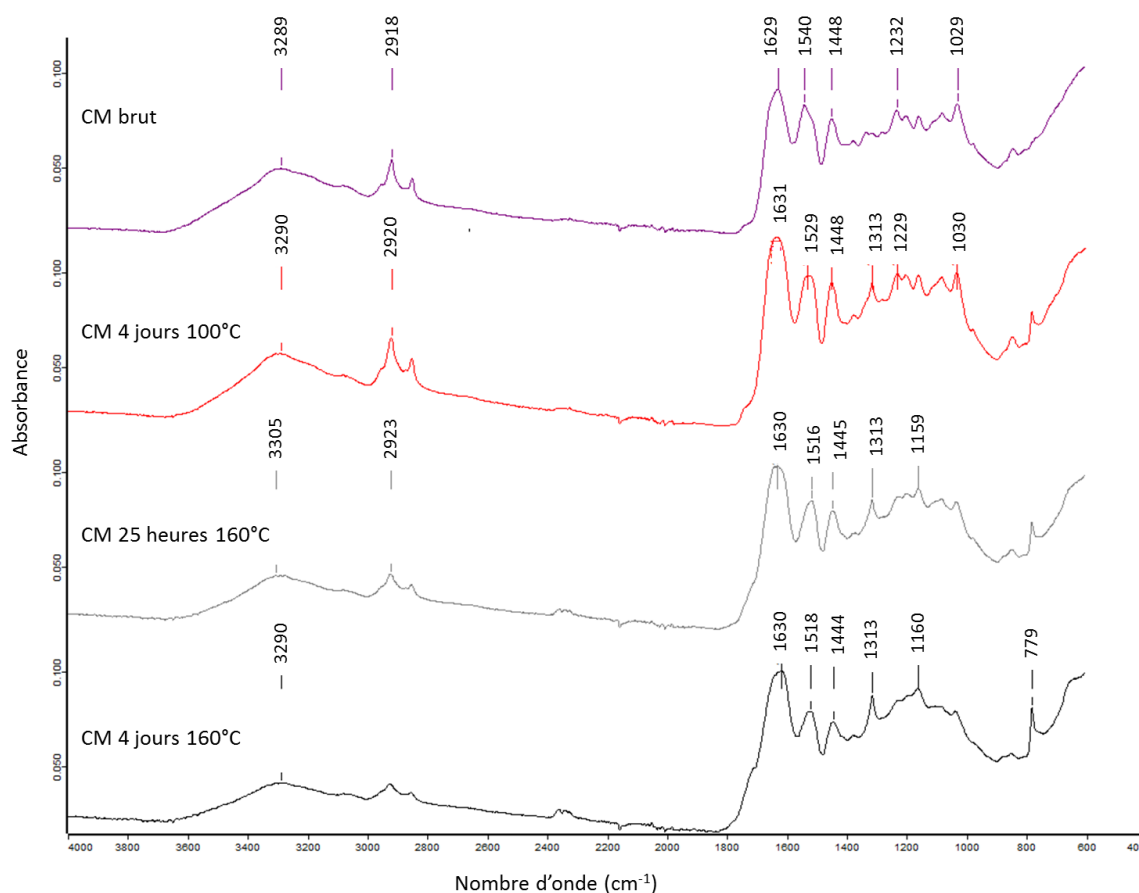


Figure 61 : Spectres infrarouge ATR réalisés entre 4000 et 600  $\text{cm}^{-1}$ . De haut en bas (brut, chauffé 4 jours 100°C, chauffé 25 heures 160°C, chauffé 4 jours 160°C).

L'analyse infrarouge permet l'étude des structures secondaires. Un maximum d'absorbance entre 1630 et 1640 $\text{cm}^{-1}$  est attribuable à la présence de feuillets  $\beta$ , un maximum entre 1648-1657  $\text{cm}^{-1}$  est attribuable à la présence d'hélices  $\alpha$ . Par ailleurs, la région comprise entre 1660 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  est attribuable à la présence de « turn » ainsi qu'aux feuillets  $\beta$  anti parallèles, également visibles au niveau de cette région (Jackson et Mantsch 1991). Le suivi pour l'ensemble des cuirs de la position de la bande amide I, aux alentours de 1630 $\text{cm}^{-1}$  ne révèle pas de transformation de la structure secondaire de type feuillet  $\beta$  après exposition à la chaleur. Par ailleurs, l'intensité de la bande amide I augmente après exposition à la chaleur, observation qui peut être corrélée avec une augmentation du nombre de structures de type feuillet  $\beta$ . Il est connu que lors d'un phénomène de chauffe, il est fréquent que les structures secondaires de type hélices  $\alpha$  évoluent en feuillets  $\beta$ . Ce résultats n'est donc pas surprenant (Kato et Takagi 1988). Le **Tableau 10** répertorie la position de certains pics d'intérêt.

	CM brut	CM 4 jours 100°C	CM 25 heures 160°C	CM 4 jours 160°C
Ecart Amide I – Amide II ( $\Delta\nu$ )	1629-1540= 89 $\text{cm}^{-1}$	1631- 1529=102 $\text{cm}^{-1}$	1630-1516= 114 $\text{cm}^{-1}$	1630- 1518=112 $\text{cm}^{-1}$
Ratio $A_I/A_{II} \rightarrow$ hydrolyse si valeur >1	1,05	1,06	1,07	1,06
Détection signal 1740 $\text{cm}^{-1}$ = oxydation	Oui (petit épaulement à 1740 $\text{cm}^{-1}$ )	Oui (petit épaulement à 1740 $\text{cm}^{-1}$ )	Oui (épaulement 1717 $\text{cm}^{-1}$ )	Oui (épaulement à 1710 $\text{cm}^{-1}$ )

*Tableau 10 : Valeurs représentatives des écarts et ratio entre bande amide I et II et étude de la bande/épaulement à 1740 $\text{cm}^{-1}$*

La valeur de  $\Delta\nu$  (écart entre Amide I et Amide II) traduit le phénomène de gélatinisation. Une valeur proche de 100 $\text{cm}^{-1}$  est attendue dans le cas d'un matériau neuf (Carçote et al. 2014). La valeur obtenue dans le cas du cuir brut est de 89 $\text{cm}^{-1}$ , elle est de 102 $\text{cm}^{-1}$  pour le cuir exposé 4 jours à 100°C, de 114 $\text{cm}^{-1}$  pour 25 heures 160°C et de 112 $\text{cm}^{-1}$  pour 4 jours à 160°C. Les valeurs augmentent après exposition à la chaleur et sont dépendantes des temps et températures d'exposition. Les valeurs obtenues dans le cas des cuirs chauffés 25 heures et 4 jours à 160°C sont similaires. Ces résultats sont en accord avec le phénomène de gélatinisation observé en microscopie.

Les ratios  $A_I/A_{II}$  (rapport Amide I/Amide II) ne mettent pas en évidence de phénomènes d'hydrolyse. Ceci est en accord avec la littérature où le phénomène d'hydrolyse est observé dans le cas d'une chaleur humide.

L'augmentation du signal de l'épaulement aux alentours de 1740 $\text{cm}^{-1}$  indique une augmentation de l'oxydation lors de l'exposition à la chaleur. Cependant, à ce nombre d'onde, il existe une bande caractéristique des corps gras qui peut interférer avec le signal caractéristique de l'oxydation. Plus la température augmente, plus l'épaulement est marqué, par ailleurs il est également dépendant du temps d'exposition (Carçote et al. 2014). Cette observation est conforme à la littérature qui décrit

des phénomènes de thermo-oxydation lors de l'exposition à une chaleur sèche, condition identique à celle de notre étude (Chahine 2013).

Par ailleurs, le phénomène de thermo-oxydation est décrit comme induisant une perte de la structure hélicoïdale et une scission des molécules de collagène. Dans le cas des cuirs, la présence de tannins stabilise la structure (Bowes et Cater 1965b; Chahine 2013). Outre ces phénomènes, elle induit également une acidification des cuirs, caractérisée par une diminution des acides aminés basiques au profit des acides (Chahine 2013).

Sur nos échantillons, cette acidification a été clairement mise en évidence par la mesure du pH de l'extrait aqueux des cuirs. Les valeurs de pH obtenues diminuent de 4, dans le cas du cuir brut, à 3,9 après 4 jours à 100°C ; à 3,6 après 25 heures 160°C et à 3,0 dans le cas du cuir exposé 4 jours à 160°C. Les valeurs obtenues dans le cas du cuir chauffé 4 jours à 160°C sont inférieures à 3,5 et constituent une acidité délétère pour le cuir d'après la Norme NF G52-214. 1976 (Barbe et al. 2006).

L'observation du profil infrarouge révèle également une diminution de la bande caractéristique des groupements CH situés aux alentours de  $3000\text{cm}^{-1}$  signe d'une altération des corps gras.

Par ailleurs, l'apparition de deux bandes fines et relativement intenses à  $1313$  et  $779\text{cm}^{-1}$  dans le cas des cuirs chauffés pourraient être attribués à une dénaturation des tannins. Seule une analyse complémentaire basée sur l'étude des tannins avant et après exposition à la chaleur permettrait de vérifier cette hypothèse.

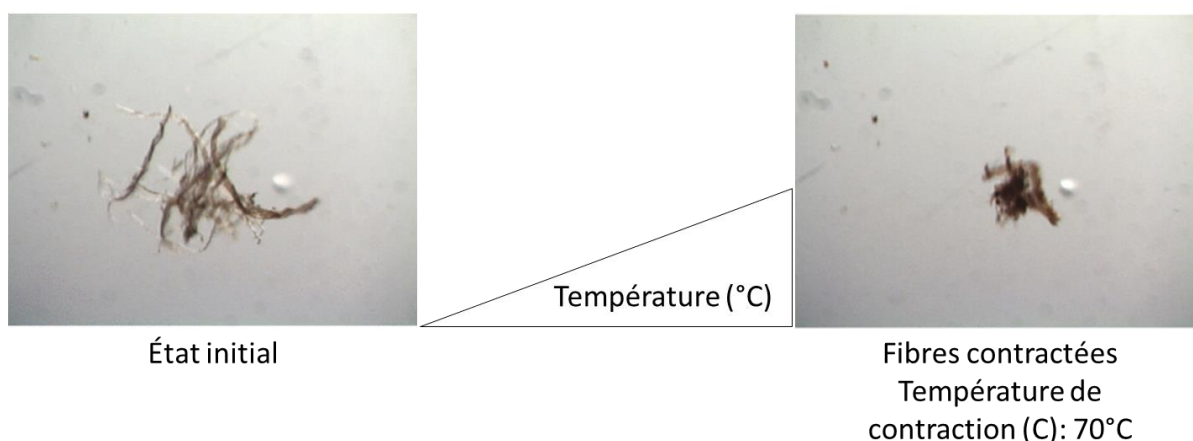
Les modifications visibles par infrarouge suite à l'exposition des échantillons à une chaleur sèche sont similaires à celles observables dans le cas de cuirs historiques présentant une oxydation ou une gélatinisation. Comme énoncée précédemment, la chaleur peut être utilisée dans le cadre de vieillissement artificiel.

Dans le cas de vieillissement naturel, la part de structures cristallines est diminuée par rapport à un cuir neuf, et sa stabilité hydrothermique est réduite. Afin de déterminer si les effets de la chaleur étaient similaires à ceux observés dans le cas des cuirs anciens, différentes analyses thermiques ont été réalisées.



## II. STABILITE HYDROTHERMIQUE DES CUIRS.

La technique de la table chauffante (MHT) permet de déterminer la température de contraction de fibres de cuir. Réalisée en présence d'un excès d'eau afin de mieux isoler les fibres et faciliter leur détérioration (Badea et al. 2008), cette technique livre des informations sur la stabilité hydrothermique des cuirs et peut être corrélée avec leur état de détérioration (René Larsen 2000; Chahine 2013). Le phénomène de contraction des fibres est un phénomène irréversible associé à la rupture des liaisons hydrogène du collagène (R. Larsen, Vest, et Nielsen 1993). La **Figure 62** présente les résultats obtenus.



*Figure 62 : Détermination de la température de dénaturation hydrothermique par observation par la méthode de la table chauffante de l'état de contraction de fibres de cuir (CM brut) immergées dans de l'eau au cours de l'augmentation de température.*

De manière générale, le phénomène de contraction des fibres est très rapide et observable pour un écart de température faible une fois la température adéquate atteinte. Les fibres contractées (température de contraction dans de l'eau : 70°C) présentent un aspect similaire à celles observées au MEB après chauffage 4 jours à 160°C. Ceci souligne l'impact néfaste de l'eau lorsqu'elle est associée à une température élevée.

La température de contraction des fibres observée dans le cas d'un cuir brut (CM brut) est de 70°C. Dans le cas d'un cuir de tannage condensé, la température de contraction attendue se situe aux alentours de 80-85°C. Dans le cas de cuirs avec tannins hydrolysables elle est de 70-75°C (Covington et Covington 2009). La détermination des températures de contraction étant visuelle, elle se fait à l'appréciation de l'expérimentateur. Cette technique est donc moins précise que lors de l'utilisation de méthodes telles que la DSC en excès d'eau ou la méthode Juliani Device. L'emploi de ces deux méthodes donne des valeurs de température de contraction comprises entre 80 et 85°C.

Dans le cas du cuir exposé à la chaleur pendant 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C), deux phénomènes de contraction distincts sont observables à respectivement 34 et 45°C. Ces phénomènes sont observés aux mêmes températures dans le cas du cuir STEP de tannage au mimosa (CM STEP). Cet abaissement significatif de la température de dénaturation des fibres après

exposition des cuirs à la chaleur traduit une diminution de la stabilité hydrothermique signe d'une détérioration des fibres de collagène (Budrueac et Miu 2008).

Les températures de dénaturation mesurées pour les cuirs sumac sont du même ordre de grandeur avec une valeur de 74,5°C pour le cuir brut et 36°C pour le cuir chauffé. Bien que les tannins aient une influence sur la stabilité hydrothermique, l'effet de l'exposition à la chaleur (sèche) sur les molécules de collagène est similaire dans le cas de tannins condensés ou hydrolysables.

Il faut cependant noter que les cuirs sumac chauffés ne présentent qu'une seule température de contraction au lieu des deux observées avec les cuirs de tannage au mimosa. Dans ce dernier cas, la présence de deux températures de contraction, traduit la présence de plusieurs populations de fibres de stabilités hydrothermiques différentes. A l'inverse, les résultats obtenus avec un tannin hydrolysable sont le signe d'une meilleure homogénéité hydrothermique. Ce résultat est en accord avec la nature des liaisons intermoléculaires induites par le procédé de tannage. Outre la formation de liaisons de faible énergie telles que des liaisons hydrogène, les tannins condensés génèrent des liaisons covalentes. Ces dernières sont plus résistantes à la chaleur que les liaisons de faible énergie, seules interactions impliquées lors du tannage au sumac. Les travaux de Miles *et al.* indiquent que la présence de liaisons covalentes réduit le pourcentage d'hydratation du matériau et augmente la stabilité thermique (Miles et al. 2005).

### III. DEVENIR DES CONSTITUANTS DU CUIR

Afin d'étudier les conséquences de l'exposition à la chaleur au niveau des structures internes du cuir, différentes méthodes d'analyses ont été utilisées. L'analyse thermogravimétrique (TGA) permet une étude des températures de perte de masse. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) fournit des informations sur les phénomènes de transition de phase et les températures associées. Cette méthode sera corrélée avec une analyse thermique-différentielle (ATD), technique d'analyse proche de la DSC qui permet la détermination de températures caractéristiques de transformations physico-chimiques impliquant un flux de chaleur. La gamme de température utilisable est plus étendue et peut atteindre 400°C.

Lors des analyses les échantillons sont soumis à un chauffage progressif de 25 à 800°C en TGA, de 25°C à 280°C pour la DSC et de 25°C à 400°C en ATD à raison d'une variation de 10°C/min. Les profils obtenus ainsi que la dérivée première des signaux dans le cas de la TGA et la dérivée seconde dans le cas de l'ATD sont présentés en **Figure 63**.

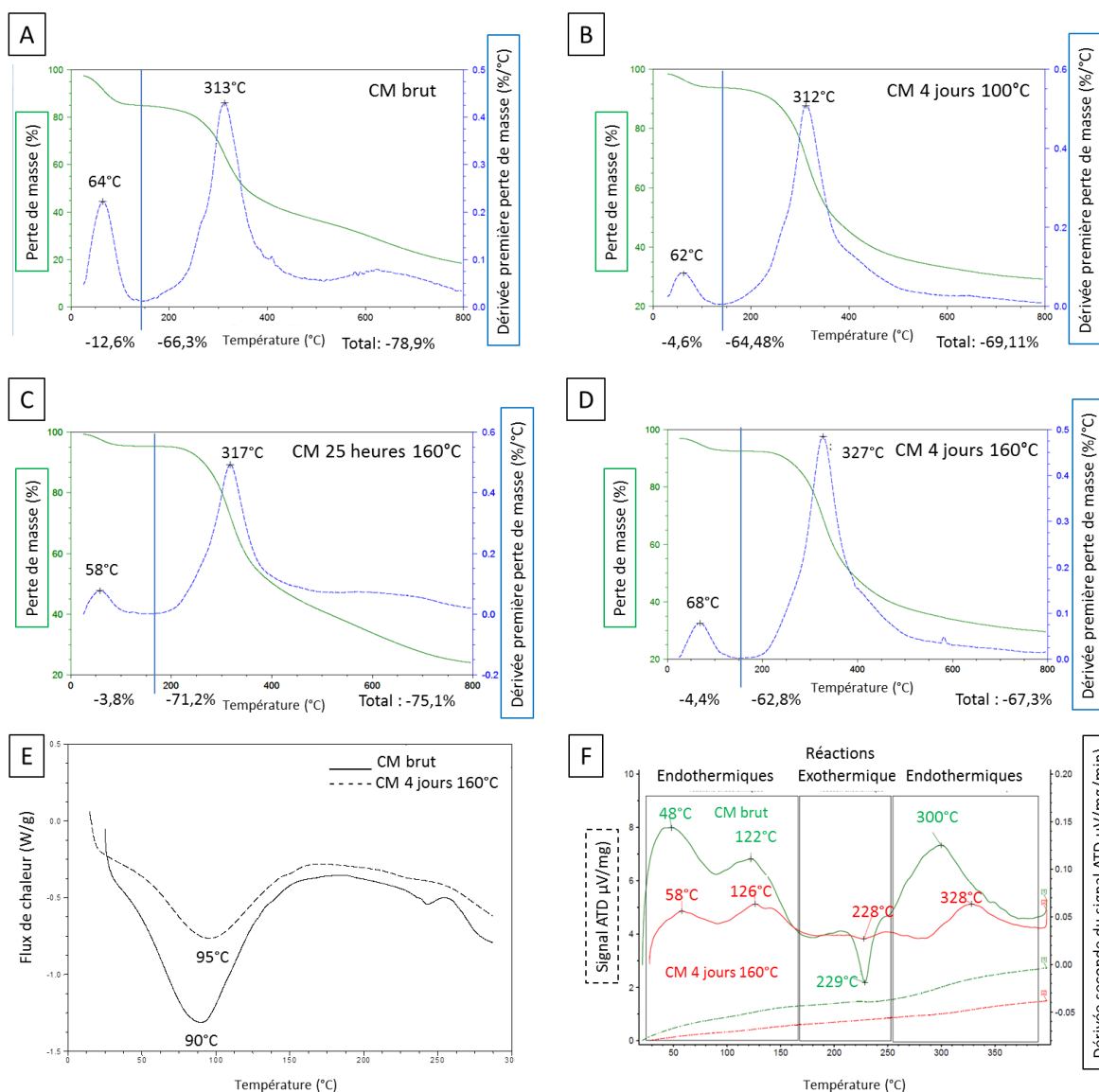


Figure 63 : [A]-[D] : Thermogrammes obtenus par analyse TGA entre 25 et 800°C dans le cas des cuirs brut [A], chauffé 4 jours à 100°C [B], 25 heures à 160°C [C] et 4 jours à 160°C [D]. Le signal vert (trait plein) représente le pourcentage de perte de masse au cours de l'augmentation de température. Le signal bleu (pointillé) représente la dérivée première du signal. Deux phénomènes distincts de perte de masse sont observés lors de l'analyse. Les pourcentages de perte de masse de chacun des phénomènes ainsi que le pourcentage total de perte de masse sont indiqués sous chacune des figures. [E] : Thermogramme obtenu par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) entre 25 et 280°C dans le cas du cuir brut (trait plein) et du cuir chauffé 4 jours à 160°C (trait pointillé). [F] : Thermogrammes obtenus par analyse ATD entre 25 et 400°C dans le cas du cuir brut (signal vert) et chauffé 4 jours à 160°C (signal rouge). Les signaux en pointillé représentent le signal ATD, ceux en trait plein la dérivée seconde indiquant les phénomènes endothermiques ou exothermiques.

Une étude combinée des résultats obtenus en TGA, DSC et ATD montre des phénomènes similaires en fonction de l'augmentation de température. Les observations seront traitées par températures croissantes indépendamment des techniques d'analyses. Il est important de préciser que les températures attribuées aux phénomènes observés en TGA, DSC et ATD tiennent compte de

l'hétérogénéité des matériaux. Ainsi un pic plus ou moins large pourra être observé. De même si deux phénomènes ont lieu à des températures proches des décalages de position peuvent être attendus.

Il sera considéré que les phénomènes situés à des températures inférieures à 100°C seront attribués de façon majoritaire à la déshydratation des échantillons.

Il existe deux types d'eau au sein du cuir : l'eau dite libre (« multilayer water ») qui n'est associée aux constituants du cuir que par des liaisons faibles et réversibles et l'eau liée qui, elle, fait intervenir des forces de liaison plus importantes. La présence d'eau libre traduit l'existence d'interactions eau-eau égales ou plus importantes que les interactions eau-« soluté » (terme générique à toutes les espèces moléculaires non aqueuses, y compris à l'état solide) ; elle est donc observée pour des teneurs en eau élevées. La disponibilité de l'eau pour la diffusion et les réactions peut être évaluée par l'activité thermodynamique de l'eau,  $a_w$ . L' $a_w$  est proportionnelle à la pression de vapeur dans le milieu. L'eau libre se situe au sein du réseau entrelacé de faisceaux de collagène, elle participe au gonflement des fibres et à leur structure en formant une gaine hydratée autour des protéines. Au contraire, l'eau liée est présente même à faible concentration hydrique et crée des interactions moléculaires directes avec les constituants de la matière. La perte de ces molécules d'eau plus fortement liées à la matière solide nécessite des énergies plus importantes ; l'eau liée est également beaucoup moins mobile que l'eau libre (Robinson et Cho 1999; Timasheff 2002; Kite et Thomson 2006; Covington et Covington 2009).

L'analyse TGA révèle deux phénomènes distincts de perte de masse. Le premier se produit majoritairement entre 25 et 140°C dans le cas des cuirs bruts et chauffés 4 jours 100°C et entre 25 et 151 ou 157°C dans le cas des cuirs chauffés 25 heures et 4 jours à 160°C, tous possèdent un premier pic de dégradation /perte de masse à environ 63°C quel que soit l'état de l'échantillon (bruts et chauffés – **Figure 63** [A]-[D]). Nous pouvons voir d'après le profil de DSC qu'à cette température aucun phénomène de transition de phase n'est observé. Observée sans ajout d'humidité, la perte de masse observée en TGA est attribuable à la déshydratation/évaporation de l'humidité intrinsèque au cuir (Ramaraj 2006). En complément, l'analyse ATD montre la présence de plusieurs pics endothermiques (maximum à 48 et 122°C) qui peuvent être attribués respectivement à la déshydratation (**Figure 63**[F]) de l'eau libre et liée de l'échantillon.

Lorsque les cuirs ont été préalablement chauffés, la quantité d'eau intrinsèque est diminuée et un chauffage plus important est nécessaire pour permettre la déshydratation. Ces résultats sont cohérents avec les pertes de masse mesurées après un chauffage à 160°C pendant 4 jours au cours duquel l'échantillon subit une forte déshydratation.

Il peut être noté que la perte de masse attribuée à la déshydratation est plus importante pour le cuir brut (12%) que pour les cuirs chauffés (4+/-0,4%) en raison de la déshydratation induite par les conditions d'exposition. La difficulté de réhydratation est liée à la réticulation des protéines et des tannins suite à l'exposition à la chaleur qui rendent les fibres plus proches les unes des autres et participent à la perte d'hydratation (Miles et al. 2005). La diminution des capacités de réabsorption d'eau peut également être la conséquence d'une perte considérable des groupements polaires des chaînes latérales par destruction ou condensation, accompagnée d'une diminution de l'aire de l'échantillons (Cassel 1958).

Le profil de DSC (**Figure 63** [E]) indique la présence d'un phénomène endothermique à 90°C dans le cas du cuir brut et à 95°C dans le cas du cuir chauffé et dont l'intensité est plus importante dans le cas du cuir brut. Un signal comparable est observé par analyse ATD. Ce phénomène endothermique pourrait être attribué d'une part à la déshydratation de l'échantillon (observée également en TGA – **Figure 63** [A]-[D]) et d'autre part à un phénomène de dénaturation du collagène similaire à celui observé en condition saturée en eau par MHT. Il faut noter que les phénomènes de dénaturation (de type « shrinkage ») sont observés à des températures supérieures dans le cas d'un échantillon peu hydraté en comparaison d'un cuir saturé en eau.

Dans le cas d'un cuir de tannage végétal saturé en eau, la température de dénaturation est de 80°C contre 100°C dans le cas d'un cuir contenant 15% d'humidité (Thomson 2006a). L'origine de la baisse d'intensité du signal observée dans le cas du cuir chauffé pourrait être la même que celle observée en TGA (déshydratation). Il est possible que ce phénomène soit également dû à une diminution de la fraction de molécules non dénaturée lors de la première exposition à la chaleur.

La présence d'un pic exothermique aux alentours de 230°C visible par analyse ATD (**Figure 63** [F]) aussi bien dans le cas du cuir brut que chauffé peut être corrélée à la présence d'interactions entre protéines (Relkin 2006).

L'exposition à la chaleur provoque un processus exothermique lié à la création d'interactions entre protéines et corrélé à une agrégation. Une autre hypothèse est basée sur le renforcement des interactions protéines-tannins de nature exothermique comme mis en évidence par microcalorimétrie (par Frazier et al. 2010).

Le profil de DSC (**Figure 63** [E]) met en évidence un deuxième pic dans le cas du cuir brut à 245°C. Il peut être attribué à la fonte des zones cristallines du cuir (Badea et al. 2008). Dans le cas du cuir chauffé, ce deuxième pic n'est pas observé dans la gamme de température analysée. Il est possible que celui-ci persiste mais à des températures supérieures à 280°C, température limite de la DSC utilisée.

En effet, l'analyse ATD (**Figure 63**[F]), dont la gamme de température permet d'atteindre 400°C, met en évidence un déplacement de la position du dernier pic endothermique vers les hautes températures de 299°C à 328°C. L'intensité du pic est diminuée ce qui pourrait être en accord avec une diminution de la fraction cristalline après exposition à la chaleur.

L'analyse DSC du cuir de tannage sumac, de tannins hydrolysables qui ne forment pas de liaisons covalentes avec les protéines et pour lesquels les températures de fonte des zones cristallines sont théoriquement inférieures, permet de confirmer cette hypothèse (**Figure 64**[A] et [B]). Deux pics distincts sont observables, le premier situé à 121°C est attribuable aux mêmes phénomènes que pour les cuirs mimosa. Le deuxième, attribué à la fonte des zones cristallines à lieu à 214°C pour le cuir brut et 228°C pour le cuir chauffé. Ce déplacement de la température de dénaturation peut être corrélé avec une fonte plus difficile. Dans le cas de vieillissement naturel, la perte de l'eau liée et la formation de liaisons covalentes au sein de la structure du collagène entraînent une augmentation de la stabilité thermique des cuirs traduite par une augmentation de la température de dénaturation du collagène (Carşote et al. 2014). Au vu de la déshydratation et de l'augmentation des interactions protéines-protéines observée précédemment grâce aux analyses thermiques, un phénomène similaire mais plus intense et destructif peut être supposé dans le cas des cuirs exposés à la chaleur.

Par ailleurs, ce déplacement vers les hautes températures peut être attribué à une dénaturation préalable de certaines protéines thermosensibles suite à l'exposition à la chaleur (Arntfield et Murray 1981). La position du pic traduit la température à laquelle a lieu un/différents événements. La dénaturation de certaines protéines, considérées comme thermosensibles, car moins fortement liées (moins de liaisons covalente et de faible énergie), dénaturées lors de la chauffe (4 jours 160°C), décale la température moyenne à laquelle a lieu le phénomène.

L'enthalpie de cristallisation exprimée en J/g est diminuée de moitié après exposition à la chaleur (de 7,6 J/g à 3,6 J/g), signe d'une diminution de la part de zones cristallines au sein du matériau. L'asymétrie du pic est sans doute due à la présence de différentes populations de collagène possédant des stabilités thermiques différentes (Cucos, Budrugaec, et Miu 2014).

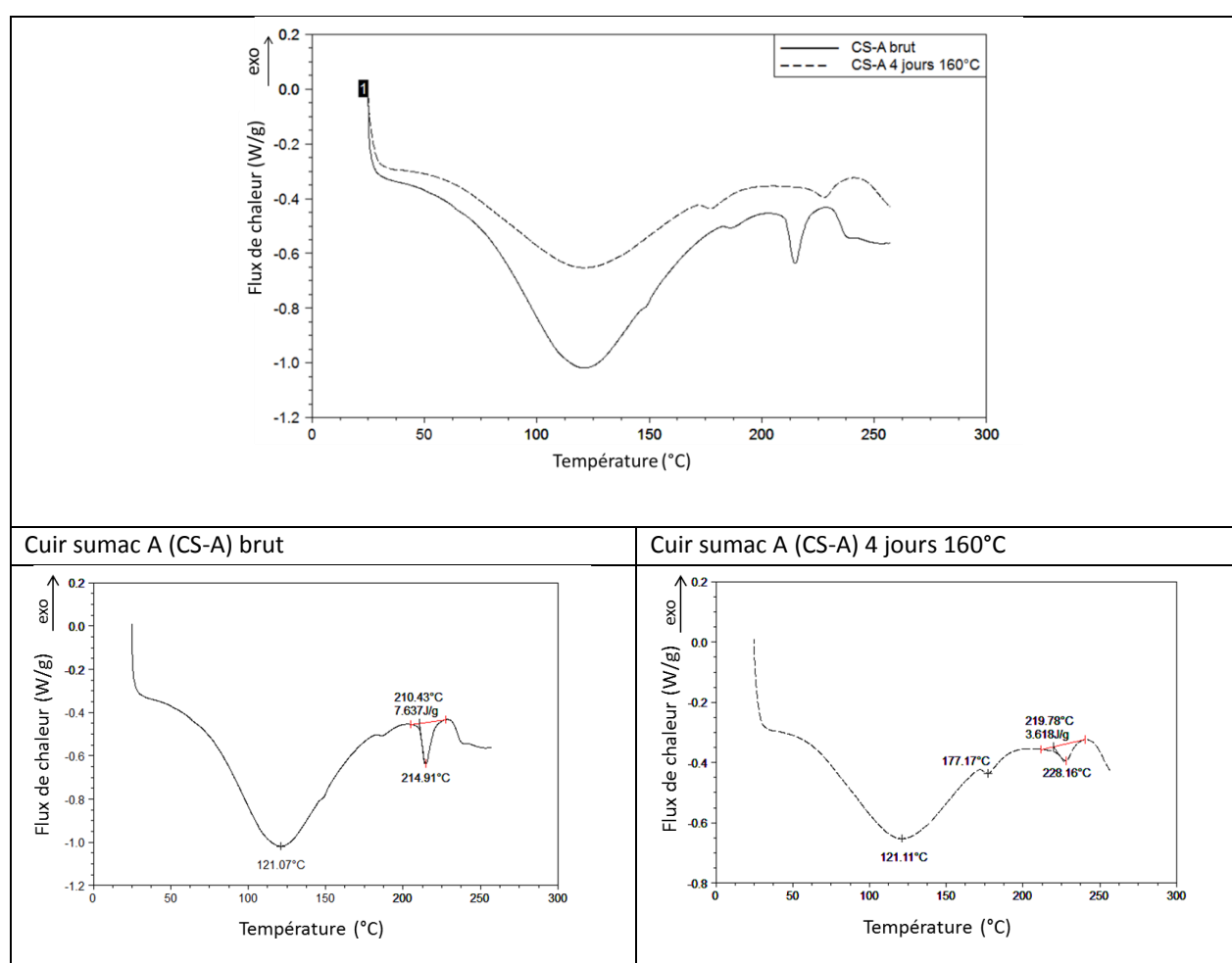
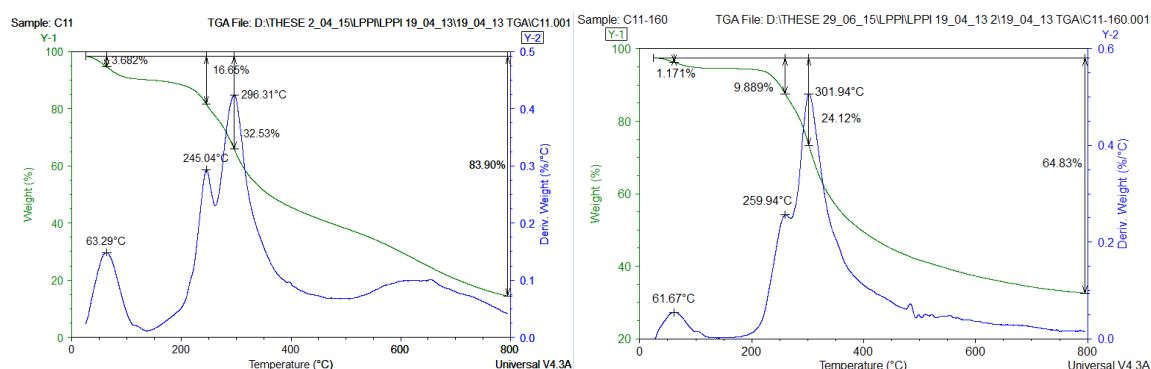


Figure 64 : Thermogrammes de calorimétrie différentielle à balayage obtenus dans le cas des cuirs de tannage au sumac brut et chauffé 4 jours à 160°C.

La deuxième perte de masse observable en TGA (**Figure 63**[A]-[D])) est visible dès 140°C dans le cas des cuirs brut et chauffé 4 jours à 100°C et dès 170°C environ dans le cas des cuirs chauffés à 160°C (25 heures et 4 jours). Pour permettre une meilleure comparaison, les pics de dégradation seront considérés lors de l'analyse par TGA. Ils se situent à 312-313°C pour les cuirs brut et chauffés 4 jours à 100°C (**Figure 63**[A],[B]), à 317°C dans le cas du cuir 25 heures 160°C (**Figure 63**[C]) et à 327°C dans

le cas du cuir 4 jours 160°C (**Figure 63[D]**). Une analyse ATD révèle la présence de phénomènes endothermiques à des températures proches de celles obtenues en TGA (respectivement 299°C pour le cuir brut et 328°C pour le cuir 4 jours 160°C). Ce phénomène de perte de masse est attribuable à une décomposition du collagène (Ramaraj 2006). Par ailleurs, l'étude menée par Bowes et Taylor en 1970, montre que l'exposition à la chaleur sèche entraîne une dégradation des acides aminés en divers composés volatils dont l'ammoniac et le dioxyde de carbone induisant une perte de masse (Bowes et Taylor 1970). Le déplacement de la position du pic vers les hautes températures après exposition à la chaleur est en accord avec les résultats obtenus par DSC et met en évidence une augmentation de la stabilité thermique du cuir.

L'analyse TGA de cuirs tannés au sumac montre des résultats qualitativement similaires à ceux obtenus dans le cas des cuirs mimosa, avec une déshydratation et un déplacement de la température de perte de masse associée à la dénaturation protéique après exposition à la chaleur. Il peut cependant être noté que dans ce cas, le profil présente trois phénomènes distincts de pertes de masses, dont les pics de dégradation sont situés respectivement à entre 63 ; 245 et 296°C pour le cuir brut contre 61; 260 et 302°C dans le cas du cuir chauffé. Cf figure ci-dessous (**Figure 65**) :



**Figure 65 : Thermogrammes obtenus dans le cas d'un cuir brut de tannage au sumac CS-A brut (gauche) et chauffé 4 jours à 160°C CS-A 4 jours 160°C (droite).**

Comme dans le cas des cuirs de tannage au mimosa, le premier pic est attribuable à la déshydratation de l'échantillon. L'hypothèse peut être faite que les deuxième et troisième pics sont attribuables à la dégradation de plusieurs populations de molécules (Tang, Covington, et Hancock 2003). Il est intéressant de noter que ces phénomènes ont lieu à des températures inférieures à celles observées dans le cas des cuirs de tannage au mimosa. Les résultats obtenus sont donc en accord avec ceux attendus. En effet, mieux stabilisés grâce à la présence d'interaction de faible (liaison H) et forte (covalente) énergie, les cuirs de tannage au mimosa présentent des pertes de masse à des températures supérieures à celles des cuirs de tannage au sumac stabilisé uniquement par liaison faible (Shuttleworth 1952a; Siebert, Troukhanova, et Lynn 1996; Covington et Covington 2009; Chahine 2013).

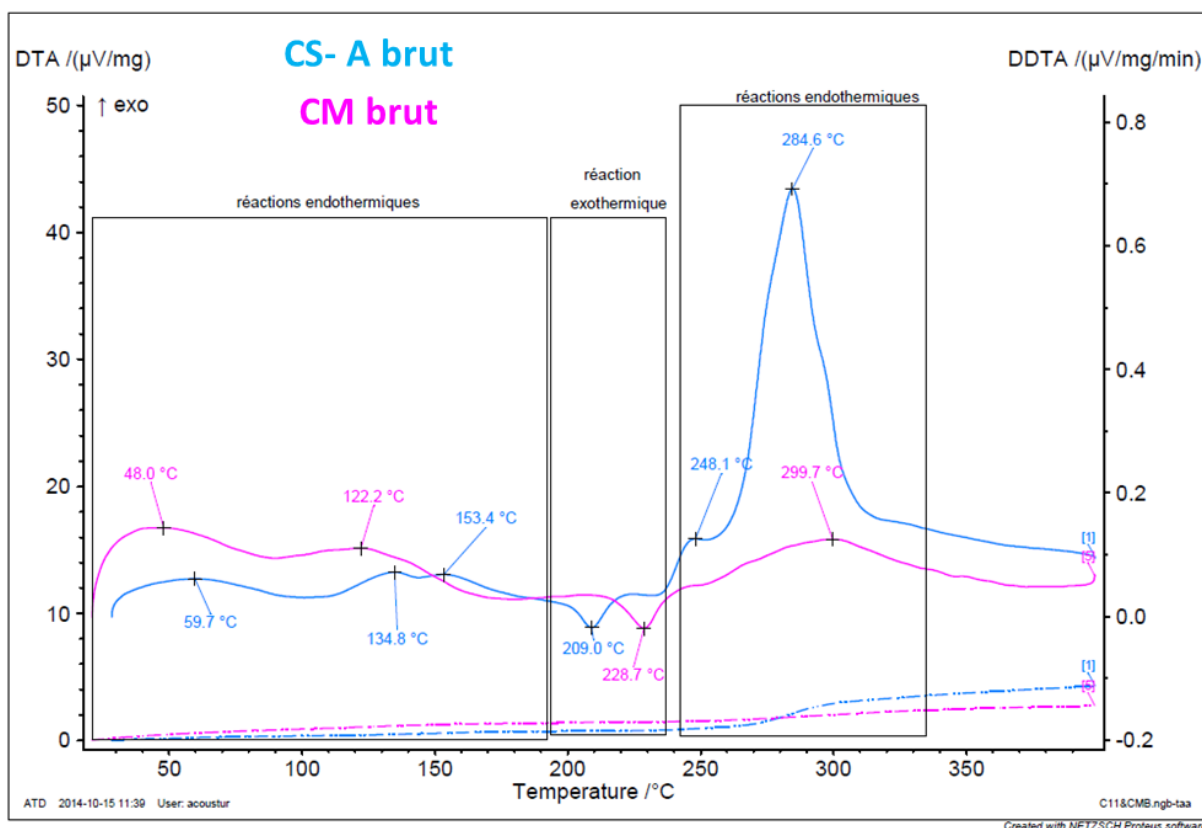
Compte tenu de la différence de profil observée entre cuirs de tannage au mimosa et au sumac, l'analyse TGA pourrait constituer une technique d'analyse permettant de déterminer la classe de tannins utilisés (condensé ou hydrolysable) dans le cas de cuirs dont le degré de détérioration n'est pas trop avancé. L'étude des cuirs RELMA, de tannage végétal de type inconnu, révèle la présence de

deux pics à des températures identiques à celles observées dans le cas des cuirs mimosa CM. L'hypothèse pourrait être formulée que ces cuirs sont de types condensés.

L'analyse ATD pourrait également constituer une technique permettant de discriminer la classe de tannin utilisée. La comparaison des profils obtenus d'une part dans le cas d'un cuir tanné au mimosa (tannins condensés) et dans le cas d'un cuir de tannage au sumac (tannins hydrolysables) révèle des différences. Le profil ATD du cuir sumac présente des pics supplémentaires et certains ont une intensité très augmentée par rapport aux cuirs avec tannins condensés.

L'analyse ATD de cuirs de tannage au sumac (**Figure 66**) révèle cinq pics endothermiques observés à 59, 134, 153, 248 et 284°C. Les trois premiers pics peuvent être corrélés à la déshydratation de l'échantillon et au phénomène de contraction des molécules de collagène également observée dans le cas des cuirs avec tannins condensés. Un pic exothermique est observé comme dans le cas du cuir mimosa à une température de 209°C. L'hypothèse de son origine reste la même à savoir une augmentation des interactions entre protéines (agrégation) et entre protéines et tannins. (Frazier et al. 2003; Relkin 2006; Frazier et al. 2010) . La différence entre les profils des thermogrammes du cuir sumac et mimosa est observable au niveau du pic endothermique majoritaire attribué à une fusion des zones cristallines. L'intensité de ce pic, situé à 284°C dans le cas du cuir sumac, est très largement augmentée en comparaison du profil du cuir mimosa et un épaulement est observable avant ce phénomène. Il est possible que ce phénomène marque également, comme dans le cas des autres techniques thermiques, une inhomogénéité de population de molécules ayant des stabilités thermiques différentes. Les différences d'intensités et de positionnement des pics observées au-delà de 200°C, c'est-à-dire sur l'échantillon déshydraté, pourraient constituer un marqueur du type de tannin utilisé.





Bien que permettant l'obtention d'informations sur les transferts énergétiques se produisant lorsque la température augmente, la DSC et l'ATD sont deux techniques différentes réalisées avec deux appareils distincts. Les conditions d'analyse ne sont pas les mêmes, pour l'analyse par DSC l'échantillon est placé dans une capsule scellée (en aluminium), alors que l'échantillon reste au contact de l'air dans le cas de l'ATD (creuset en alumine). Ces paramètres ainsi que les différences de sensibilité des deux appareils peuvent expliquer la présence de variations, parfois importantes entre les profils de DSC et d'ATD. De plus contrairement à la DSC, l'ATD ne permet pas d'associer un phénomène thermodynamique à un évènement (fusion, cristallisation, dégradation...). La présence d'un pic exothermique ne peut donc pas être attribuée avec certitude à un phénomène de cristallisation.

#### IV. EFFET DE LA CHALEUR SUR LES CONSTITUANTS PROTEIQUES

Les conséquences de l'exposition à la chaleur au niveau des constituants protéiques du cuir ont été étudiées par dosage protéique et Western Blot.

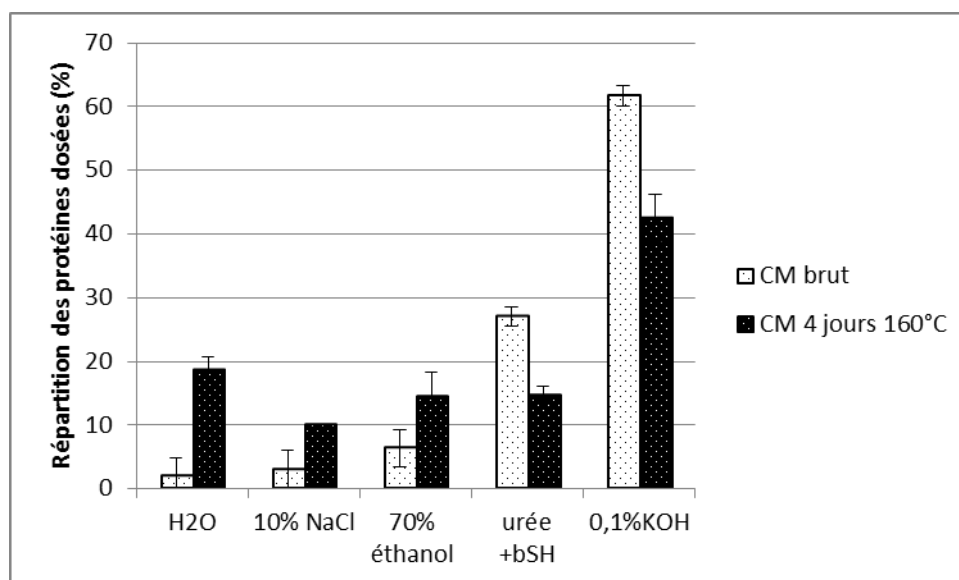
Les études biochimiques ont été réalisées sur les différentes fractions protéiques obtenues séquentiellement par immersion de morceaux de cuir dans cinq solutions de plus en plus dénaturantes (fraction 1 : eau ; fraction 2 : 10% NaCl ; fraction 3 : 70% éthanol ; fraction 4 : 8M urée +2%  $\beta$  mercaptoéthanol ; fraction 5 : 0,1% hydroxyde de potassium). Deux techniques biochimiques ont été réalisées afin de suivre l'effet de la chaleur au niveau protéique. Dans un premier temps un dosage de protéines extraites indiquant leur répartition au sein des différentes fractions a été réalisé. Dans un second temps, la recherche de protéines d'intérêt au sein des différentes fractions a été réalisée par une technique d'immuno-détection (Western Blot).

##### IV.1. REPARTITION DES PROTEINES EXTRAITES

Cette expérience permet l'étude de la répartition des protéines extraites au sein des différentes fractions dans le cas de cuirs bruts ou chauffés.

La méthode de dosage choisie est celle du TNBS (ou dosage de Fields), il repose sur la détection des groupements amines libres.

Dans un premier temps, le dosage a été effectué à partir des extraits protéiques obtenus sans traitement préalable particulier. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 67**.

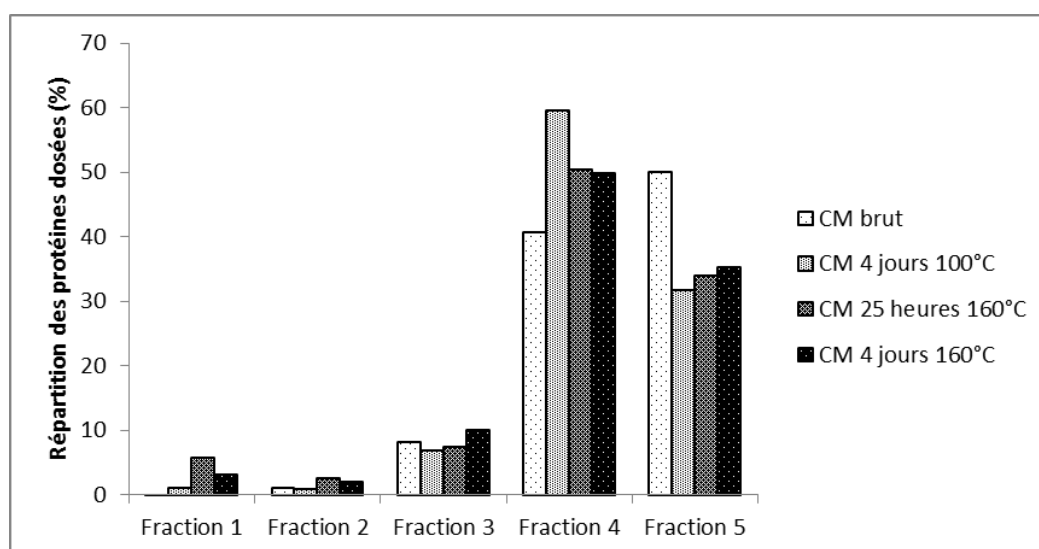


*Figure 67 : Répartition des protéines dosées (%) au sein des différentes fractions. Les fractions ont été obtenues par immersion de pièce de cuir dans des solutions de plus en plus dénaturantes ( 1 : eau ; 2 : 10%NaCl ; 3 : 70% éthanol ; 4 : 8M urée +2%  $\beta$  mercaptoéthanol ; 5 : 0,1% hydroxyde de potassium).*

Le profil de répartition des protéines extraites révèle une extraction plus importante de protéines du cuir exposé à la chaleur dans le cas des trois premières fractions (eau, 10% NaCl, 70% éthanol). Le profil s'inverse ensuite dans le cas des deux dernières fractions.

Les extraits présentent des colorations différentes en fonctions des fractions et de l'état du cuir (brut ou chauffé). La coloration observée dans le cas des cuirs chauffés est plus intense que celle des cuirs bruts. Cette coloration pourrait être attribuée à la présence de tannins au sein des solutions.

Afin de s'affranchir de la présence de tannins qui entrent en interaction avec les réactifs du dosage protéique, l'ensemble des fractions ont été centrifugées sur Centricon®. Comme présenté précédemment les tannins en tant que tels possèdent une masse moléculaire de 3000 Da. Afin d'éviter leur interférence lors du dosage, un seuil de coupure de 10 KDa a été choisi. La fraction retenue a été re-solubilisée dans de l'eau puis dosée. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 68**.



*Figure 68 : Répartition des protéines dosées (%) au sein des différentes fractions après centrifugation sur Centricon® (seuil de coupure 10 kDa). Les fractions ont été obtenues par immersion de pièce de cuir dans des solutions de plus en plus dénaturantes ( 1 : eau ; 2 : 10%NaCl ; 3 : 70% éthanol ; 4 : 8M urée +2%  $\beta$  mercaptoéthanol ; 5 : 0,1%hydroxyde de potassium).*

Le profil de répartition des protéines dosées au sein des différentes fractions révèle, quel que soit le type de cuir étudié, une faible proportion de protéines au sein des fractions 1 et 2 (<10%) ; une proportion relativement faible ( $5 < x < 10\%$ ) dans le cas de la fraction 3 et un maximum de protéines dans les deux dernières fractions (de l'ordre de 40 à 60% dans le cas de la 4<sup>ème</sup> fraction et de 30 à 50% pour la 5<sup>ème</sup>). Pour l'ensemble des cas, le pourcentage de protéines dosées est corrélé avec le pourcentage de protéines extraites du cuir.

Des différences de pourcentage de protéines extraites sont observables entre cuirs bruts et chauffés pour la première fraction (eau) et dans le cas des deux dernières fractions (urée +  $\beta$  mercaptoéthanol et hydroxyde de potassium).

Dans le cas de la première fraction d'extraction, les résultats du dosage mettent en évidence un pourcentage de protéines plus important dans le cas des cuirs chauffés en comparaison du cuir brut. Il a été montré précédemment que l'exposition à la chaleur sèche entraîne des phénomènes d'oxydation (Chahine 2013). Ce phénomène est à l'origine d'une scission de la molécule de collagène

(Kennedy et Wess 2003; Della Gatta et al. 2005). Les fragments ainsi obtenus s'échappent du cuir lors des extractions.

Le maximum de protéines extraites est observable dans le cas de la fraction 4 (8M urée +2% mercaptoéthanol). Dans le cas des cuirs chauffés, le pourcentage de protéines extraites est supérieur à celui observé dans le cas du cuir brut. Cette fraction constitue un milieu très réducteur et va permettre de rompre les liaisons liées à l'oxydation, alors que les interactions de faible énergie seront affectées par la présence de l'urée. L'ensemble des résultats sont en accord avec l'observation d'un phénomène d'oxydation et d'agrégation lors de l'exposition à la chaleur.

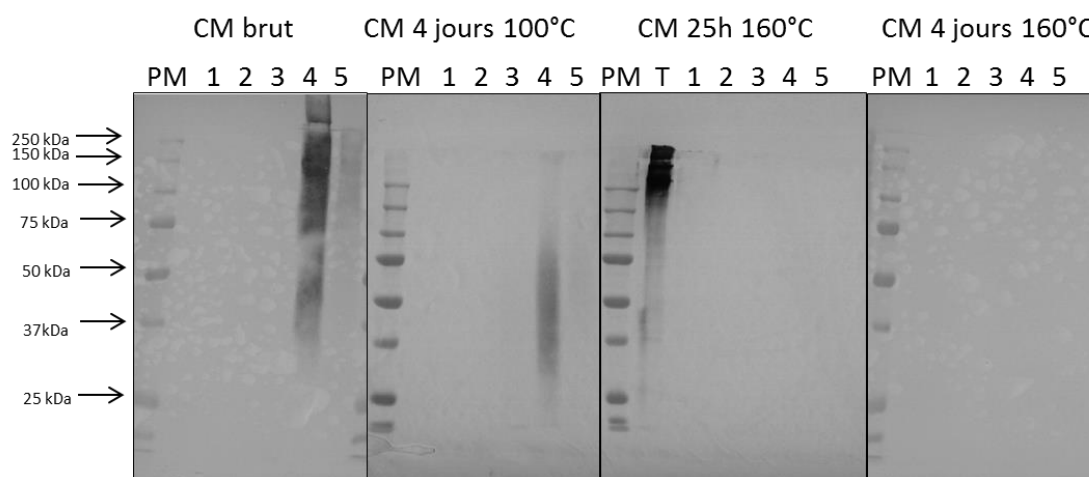
Afin de déterminer si certaines protéines étaient extraites de la même façon dans le cas d'échantillons chauffés, la technique du Western Blot a été utilisée.

#### IV.2.IMMUNO-DETECTION DE PROTEINES D'INTERET.

Cette méthode repose sur le principe de l'immuno-détection d'une protéine d'intérêt au sein des fractions d'extraction.

Des essais de ciblage de molécule de collagène ont été entrepris sans succès. L'augmentation des interactions inter et intra moléculaires de faible et forte énergie au niveau du collagène suite au processus de fabrication du cuir est très certainement à l'origine de l'absence de détection. Ainsi les molécules de collagène stabilisées ne peuvent être extraites et/ou l'anticorps choisi ne peut accéder au site de reconnaissance. L'immuno-détection d'une autre protéine d'intérêt, la fibronectine, a été entreprise.

Les résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 69**). La présence d'un signal traduit la présence de fibronectine au sein des fractions correspondantes.



*Figure 69 : Immuno-détection de la présence de fibronectine au sein des différentes fractions d'extraction protéique par la technique du Western Blot. Les différentes fractions sont les suivantes : 1 : eau ; 2 : 10% NaCl ; 3 : 70% éthanol ; 4 : 8M urée + 2%  $\beta$ -mercaptoéthanol ; 5 : 0,1% d'hydroxyde de potassium. Le témoin utilisé (T) est de la fibronectine. L'observation d'un signal traduit la présence de fibronectine.*

Les résultats obtenus dans le cas du cuir brut mettent en évidence la présence de fibronectine pour les extractions réalisées en présence d'urée en conditions réductrices (4) ou en présence de potasse (5), soit en conditions très dénaturantes. L'absence de bandes nettes au profits de smirs traduit la

présence de fragments de tailles diverses. L'intensité du signal est plus forte pour l'extraction à l'urée, indiquant que ce milieu moins dénaturant que la potasse permet l'extraction d'une partie importante de la protéine et/ou de ses fragments.

Dans le cas de l'exposition du cuir pendant 4 jours à 100°C, un smir est visible pour la conditions 4. L'intensité du signal est cependant beaucoup plus faible que dans le cas du cuir brut, de plus aucune détection de bande n'a lieu dans la condition 5. Il peut être conclu que l'exposition à la chaleur rend les protéines, notamment la fibronectine plus difficilement extractible.

Après exposition des échantillons à 160°C pendant 25 heures ou 4 jours, aucun signal n'est détecté. Ceci indique une absence de fibronectine extraite dans les fractions après exposition à la chaleur. Deux hypothèses sont possibles : soit l'exposition à la chaleur a provoqué une modification importante de la structure de la fibronectine, celle-ci est toujours extraite mais n'est pas reconnu par l'anticorps, soit la fibronectine n'est plus extractible après exposition à la chaleur.

### Discussion et conclusion

L'exposition à la chaleur induit une gélatinisation (fonte des structures cristallines) accompagnée d'une thermo-oxydation comme montré par l'acidification des cuirs après exposition à la chaleur. Ces deux phénomènes de détérioration des cuirs, également observables dans le cas de cuirs historiques sont accompagnés de modifications de la structure du collagène qui reste cependant cohésive et maintenue grâce aux nombreuses interactions stabilisatrices qui s'opèrent entre protéines et entre protéines et tannins évitant une perte totale de la structure.

L'ensemble des analyses physico-chimiques et biochimiques entreprises sont en accord avec ces données et sont cohérentes entre elles.

Les résultats mettent en évidence après exposition à la chaleur une diminution importante de la stabilité hydrothermique des cuirs signe d'une perte de la structure du collagène ainsi qu'une fonte des zones cristallines du cuir. La quantité de zones cristallines encore présentes au sein du matériau après 4 jours d'exposition à 160°C est diminuée de moitié.

L'exposition à une chaleur sèche entraîne également une déshydratation de l'échantillon. Cette perte en eau a pour effet de rapprocher les molécules de collagène qui peuvent alors créer de nouvelles interactions entre elles et via les tannins et ainsi former des liaisons covalentes supplémentaires. Ce phénomène est observable par l'augmentation de la stabilité thermique du cuir après exposition à la chaleur et grâce aux techniques d'analyses biochimiques qui montrent la difficulté ou l'absence d'extraction/solubilisation de certaines protéines après exposition à la chaleur.

Des résultats qualitativement identiques sont observables dans le cas des cuirs de tannage au sumac, indiquant un effet de la chaleur indépendant du type de tannin végétal utilisé et montrent une fois de plus un effet de la chaleur plus marqué mais additionnel avec le temps d'exposition à la chaleur.

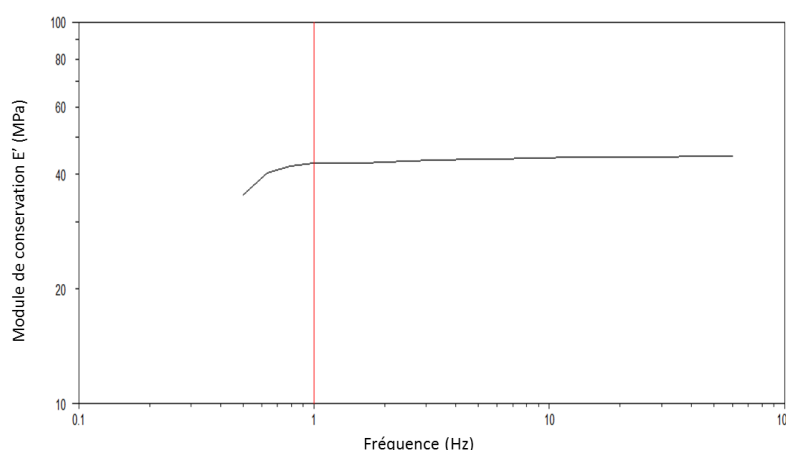
Afin de voir si l'ensemble de ces modifications pourraient être à l'origine de l'apparition de la rigidité après exposition à la chaleur, différentes méthodes d'analyses mécaniques ont été utilisées afin de quantifier les effets de la chaleur sur les propriétés mécaniques des cuirs.

## C. Conséquences de l'exposition à la chaleur sur les propriétés mécaniques

Deux techniques d'analyses ont été utilisées pour étudier les propriétés mécaniques des cuirs et les conséquences de l'exposition à la chaleur : la rhéologie et l'analyse mécanique dynamique (DMA). Ces deux techniques d'analyses sont non-destructives et particulièrement intéressantes car elles permettent une étude systématique sur les mêmes échantillons avant et après exposition à la chaleur. Une telle approche est essentielle pour s'affranchir des variations de propriétés mécaniques parfois importantes rencontrées sur les cuirs selon la zone de prélèvement des échantillons en raison de l'hétérogénéité de la peau.

En effet, compte tenu de la grande variabilité des valeurs obtenues, cette méthode a fait l'objet d'un grand nombre de vérifications afin de s'assurer que les variations observables entre échantillons voisins étaient effectivement attribuables aux propriétés de la peau anisotrope et non pas à la mesure en elle-même.

Dans un premier temps, des mesures en balayage de fréquence, entre 0,5 et 60Hz, ont été effectuées afin de déterminer la plage de fréquence pour laquelle le signal était stable (**Figure 70**).



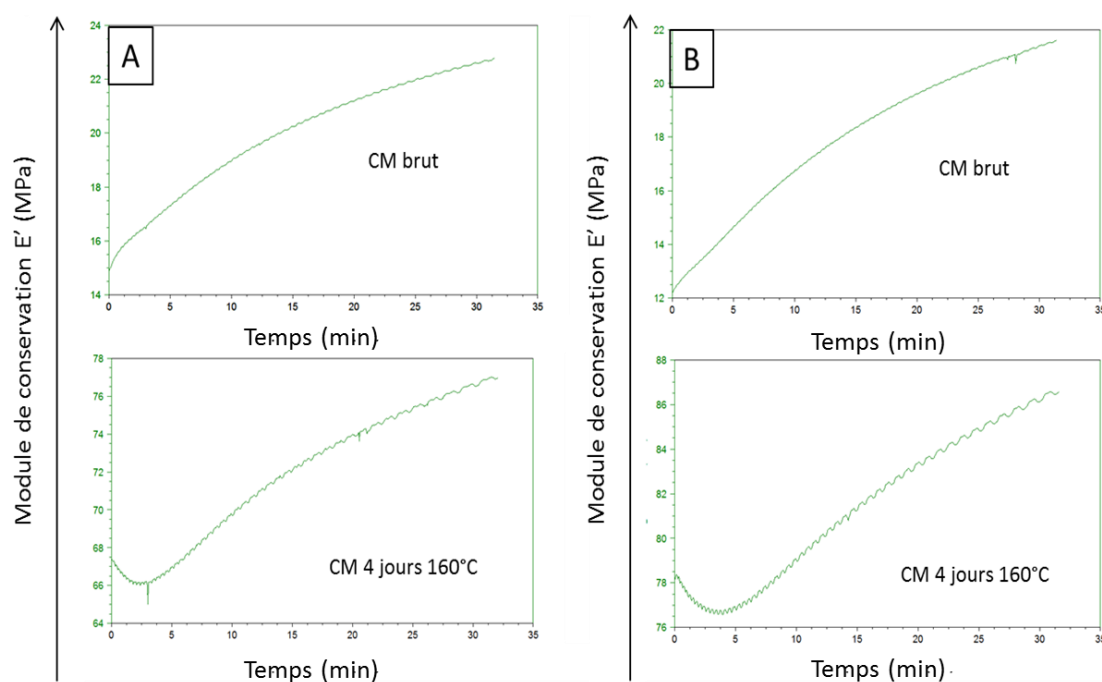
*Figure 70 : Détermination de la plage de fréquence stable dans le cas d'un échantillon de cuir mimosa brut (CM brut).*

La détermination de la fréquence pour les mesures en cinétique a été effectuée à partir des observations du signal en échelle logarithmique. La fréquence de référence choisie est de 1 Hz. Les résultats obtenus pour les différents échantillons ont ensuite pu être comparés entre eux pour une même fréquence.

Les mesures ont ensuite été effectuées en cinétique pour une fréquence donnée. La durée de l'acquisition a été fixée à 15 minutes.

Après étude des profils obtenus dans le cas de différents échantillons de cuirs, il a été choisi de relever la valeur de module de conservation observée au début de l'acquisition, soit au temps zéro, pour pouvoir comparer les valeurs de modules observées entre échantillons. En effet, le signal est

variable au cours de la cinétique et les variations observées dépendantes des échantillons et de leur état comme montré dans la figure ci-dessous (**Figure 71**).



*Figure 71 : Variations de signal observées en fonction de l'état de l'échantillon et au cours de la cinétique de mesures des valeurs de module de conservation  $E'$  réalisée à une fréquence de 1Hz sur une durée de 15 minutes. Les mesures ont été effectuées sur plusieurs échantillons. Les résultats sont présentés dans le cas des échantillons de cuir mimosa A [A] et B[B] dans différents états (CM brut, CM 4 jours 160°C, CM 4 jours 160°C – émulsion avec ou sans enzyme).*

Les résultats obtenus mettent en évidence des variations de profil, lorsqu'ils ne sont pas exprimés en échelle logarithmique au cours de la mesure et dépendant de l'état de l'échantillon (brut, chauffé, chauffé traité). Les profils obtenus semblent être la signature de l'état de l'échantillon (tests réalisés sur plusieurs échantillons). Au vu de ces résultats et pour une meilleure comparaison des résultats entre échantillons, il a été choisi de prendre la première valeur de module de conservation observée pour effectuer les comparaisons.

Ainsi les variations de propriétés mécaniques observées entre échantillons n'est pas attribuable à la technique mais effectivement aux variations de propriétés intrinsèques à la peau comme en témoigne la **Figure 72** reliant les valeurs observées au nombre d'éprouvettes caractérisées.

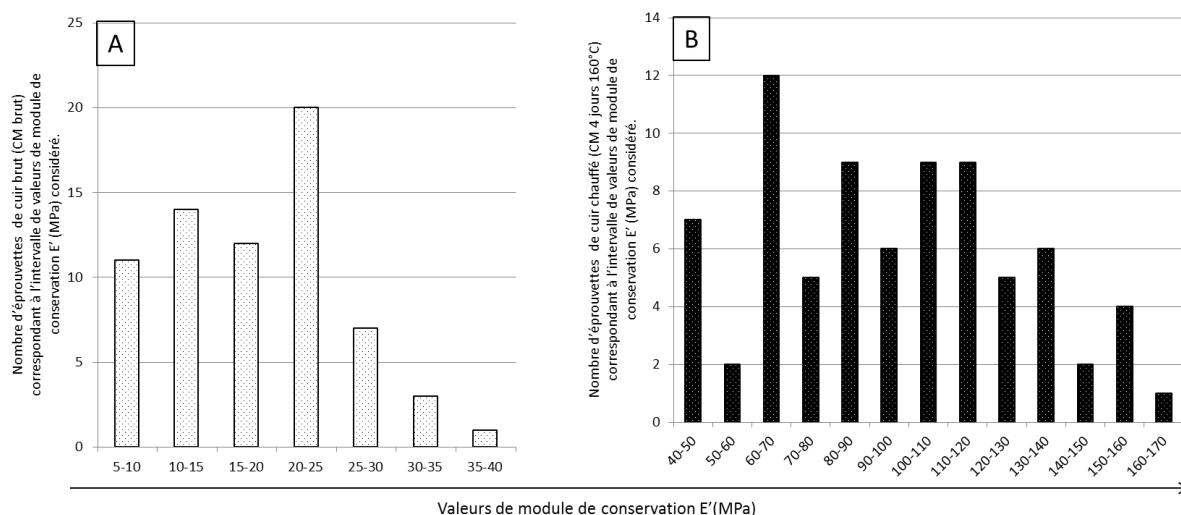


Figure 72 : Nombre d'éprouvettes de cuir brut (CM brut) [A] ou chauffé 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C) [B] correspondant aux différents intervalles de valeurs de module de conservation  $E'$  (MPa).

Les valeurs observées aussi bien dans le cas des échantillons de cuir brut que chauffés varient du simple au double entre certaines éprouvettes. Ce résultat met en évidence la grande variabilité de propriétés mécaniques entre échantillons voisins au niveau de la peau, nécessitant une technique d'analyse non destructive.

La technique de la rhéologie et celle de la DMA permettant l'obtention de données complémentaires, elles seront traitées ensemble.

## I. CONSEQUENCES DE L'EXPOSITION A LA CHALEUR SUR LA FLEXIBILITE DU CUIR.

Les effets de la chaleur sur les cuirs ont été étudiés d'une part par rhéologie et d'autre part par DMA. La rhéologie renseigne sur les propriétés mécaniques et visco-élastiques des cuirs à travers les valeurs de modules de stockage ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) lors de l'application d'une contrainte circulaire en surface de l'échantillon. Les valeurs de  $G'$  font référence à l'élasticité du réseau dépendant de la densité de lien et de la rigidité du réseau. Les valeurs de  $G''$  renseignent sur la mobilité des molécules et la déshydratation.

La DMA grâce à l'étude des valeurs du module de conservation  $E'$  renseigne sur la rigidité du matériau lors de la sollicitation sinusoïdale d'une éprouvette de cuir en tension.

Les mesures ont été réalisées avec les deux techniques à 1Hz, sur des cuirs bruts et ayant été chauffés. Dans le cas de la DMA, les valeurs ont été relevées au début de l'acquisition de l'étirement. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport aux valeurs obtenues dans le cas des cuirs bruts, pour lesquels une valeur arbitraire de 1 est attribuée. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 73**.



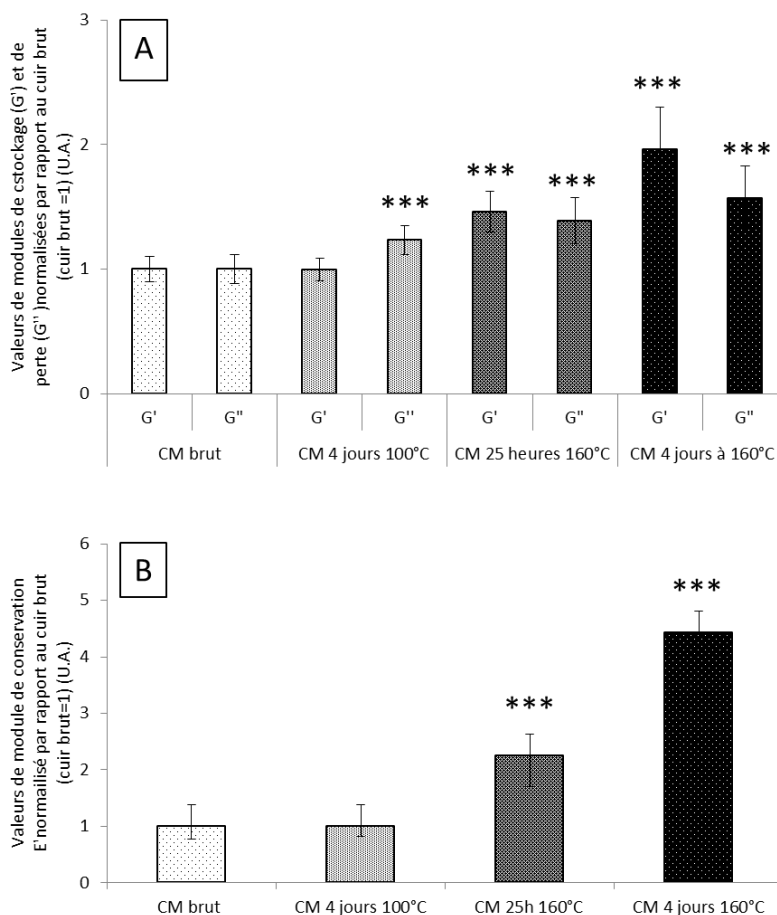


Figure 73 : Mesure des propriétés mécaniques de cuirs bruts et exposés à la chaleur pendant 4 jours à 100°C, 25 heures à 160°C et 4 jours à 160°C. Les valeurs sont normées par rapport au cuir brut (cuir brut=1) [A] : Mesure des modules de conservation G' et de perte G'' par rhéologie, [B] : Mesure des modules de conservation E' par DMA. Les tests statistiques sont calculés par rapport aux valeurs des échantillons bruts avec  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\*.

Les résultats obtenus par rhéologie (cf **Figure 73**[A]) dans le cas du cuir chauffé 4 jours à 100°C ne révèlent pas d'augmentation des valeurs de module de stockage mais une augmentation du G''(module de perte) par rapport au cuir brut. Ceci indique qu'après exposition pendant 4 jours à 100°C, la rigidité du matériau n'est pas augmentée (G' identique) mais que la densité de molécule au sein du cuir est plus importante (G'' augmenté), signe d'une déshydratation de l'échantillon.

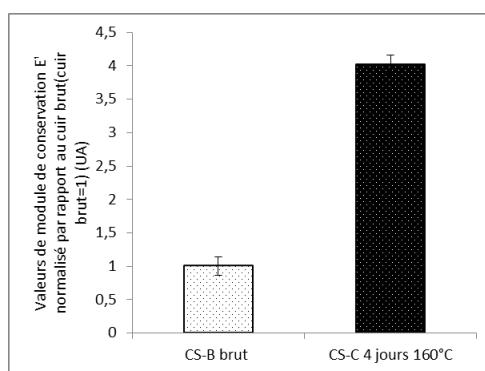
Après 25 heures et 4 jours à 160°C, les valeurs de G' et G'' augmentent de manière significative (respectivement d'un facteur 1,5 et 1,4 pour le cuir chauffé 25 heures et d'un facteur 2 et 1,6 pour celui chauffé 4 jours) par rapport au cuir brut. Les valeurs obtenues dans le cas du cuir chauffé 4 jours à 160°C sont supérieures à celles obtenues dans le cas 25 heures à 160°C, elles même supérieures à celles du cuir 4 jours 100°C.

Dans le cas des mesures de DMA (cf **Figure 73**[B]), l'exposition 4 jours à 100°C ne révèle pas d'effet sur les valeurs de module de conservation. Après exposition pendant 25 heures à 160°C les valeurs de modules de conservations augmentent d'un facteur 2,25 et d'un facteur 4,43 pour un chauffage de 4 jours à 160°C en comparaison du cuir brut.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence quelles que soient les conditions d'exposition à la chaleur une déshydratation des échantillons traduite par une augmentation des valeurs de  $G''$ . Elle est plus prononcée lorsque la température ou le temps de chauffe est important. Les deux techniques mettent en évidence une rigidification du réseau et du matériau dans sa globalité comme montré par l'augmentation des valeurs de  $G'$  et  $E'$ . Elle est dépendante des facteurs de température et de temps d'exposition. Les deux effets semblent synergiques.

Ces résultats sont en accord avec les perceptions sensorielles de l'augmentation de rigidité et les mesures de déshydratations faites par analyses thermiques.

Des résultats similaires sont observés dans le cas des cuirs de tannage au sumac (cf **Figure 74**) par conséquent le phénomène de rigidification des échantillons suite à l'exposition à la chaleur ne semble pas dépendant du tannins.



**Figure 74 :** Mesure des modules de conservation  $E'$  par DMA sur les cuirs de tannage au sumac bruts et après exposition à 160°C durant 4 Jours. Les valeurs sont normées par rapport au cuir brut (cuir brut=1).

Ces résultats nous confortent dans le but fixé initialement de redonner de la souplesse aux cuirs afin de les rendre à nouveau manipulables.

Afin de mieux comprendre les effets du temps d'exposition à la chaleur sur les propriétés mécaniques du cuir, une analyse en DMA réalisée sur 4 jours à 160°C et suivie en temps réel a été menée. Ces résultats ont été corrélés avec ceux obtenus par analyse thermo-différentielle et gravimétrie.

## II. CINETIQUE D'EVOLUTION DES PROPRIETES AU COURS DE L'EXPOSITION A LA CHALEUR

La cinétique d'évolution des propriétés mécaniques et énergétiques ainsi que de la masse au cours de l'exposition à la chaleur ont été étudiées par DMA et ATD/ATG.

Dans tous les cas, les échantillons sont placés dans l'appareil de mesure à l'état brut (non chauffé), puis chauffés à 160°C pendant environ 4 jours (4 jours pour les analyses ATD/ATG et 3 jours et 8 heures pour la DMA) et les variations observées au cours du temps. A la fin de l'analyse on peut considérer que les échantillons sont dans le même état que les échantillons CM 4 jours 160°C (chauffage réalisé dans une étuve). Une comparaison des échantillons sera donc possible.

Dans le cas de l'analyse par DMA, les valeurs de module de conservation  $E'$  traduisant la rigidité et les variations dimensionnelles (longueur) ont été mesurées. L'étude ATD/ATG permet d'observer les variations énergétiques au cours de l'exposition à la chaleur ainsi que les pertes de masse. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 75**.

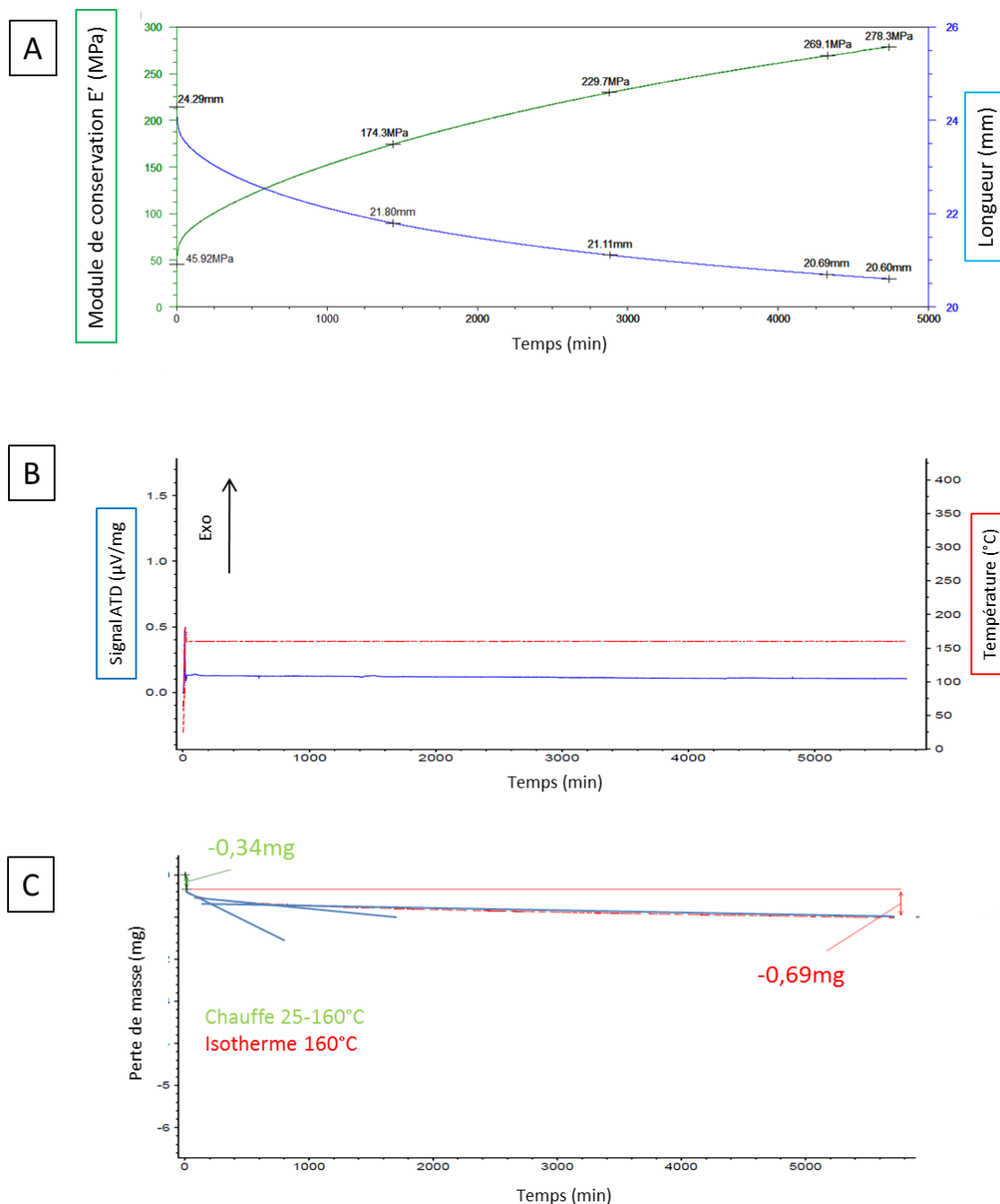


Figure 75 : Cinétiques d'évolution d'un échantillon de cuir soumis à un chauffage à 160  $^{\circ}C$  pendant 4 jours [A] Mesures du module de conservation  $E'$  et de la longueur par DMA. [B] Mesure des propriétés énergétiques par ATD. [C] Mesure de la masse par TGA.

Les résultats obtenus par DMA (**Figure 75[A]**) mettent en évidence une diminution de la taille de l'échantillon au cours de l'exposition à la chaleur. A la fin de l'analyse (soit 80h : 4800minutes), la rétraction mesurée par DMA est de 15,2%. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle observée dans le cas des échantillons CM 4 jours 160°C qui était de 17,5%. Le suivi des valeurs dimensionnelles montre que le phénomène est plus marqué lors des premières 24 heures avec une diminution de l'ordre de 10,3% contre respectivement 3,2 et 2% lors des deuxième et troisième jours.

Le suivi des valeurs de module de conservation  $E'$  révèle une augmentation progressive au cours du temps corrélée avec une augmentation de la rigidité des échantillons. Le phénomène est plus marqué lors des premières 24 heures avec une augmentation de la rigidité de l'ordre de 55% de la variation totale (45MPa à 174MPa pour une valeur finale à 278MPa) contre respectivement 23 et 17% lors des deuxième et troisième jours. L'évolution des propriétés mécaniques des échantillons semble donc dépendante du temps d'exposition. L'absence de plateau au niveau des valeurs de module  $E'$  corrobore cette conclusion.

L'analyse du profil de DMA nous a permis de déterminer la condition d'exposition à la chaleur 25 heures à 160°C. Deux allures distinctes sont observées. Le changement de pente observé peut être corrélé à la présence de deux phénomènes distincts. Afin de déterminer le point d'inflexion correspondant au moment où la variation de valeur de module apparaît, une première droite partant de l'ordonnée à l'origine a été tracée. La seconde droite a été tracée au niveau de la deuxième allure observable. Le temps correspondant au point d'inflexion est de 25 heures. Cette condition permettra de comparer les effets de la chaleur due au temps d'exposition et à la température comme réalisé depuis le début du manuscrit.

L'analyse thermo différentielle (**Figure 75[B]**) met en évidence des variations énergétiques lors de l'étape de chauffage entre 25 et 160°C. En revanche lors de l'isotherme en température, aucune variation significative d'énergie n'est observée.

L'étude des variations de masse au cours de l'exposition à la chaleur par TGA (cf **Figure 75[C]**) met en évidence une perte de 0,34mg soit 2,8% de la masse durant la phase de montée en température. Cette perte de masse pourrait être attribuée à la déshydratation de l'échantillon cependant au vu des caractérisations de perte de masse précédentes il semble que toute l'eau intrinsèque n'est pas encore évaporée. Au cours de l'isotherme pendant 4 jours à 160°C, l'échantillon continue à perdre en masse progressivement. La perte est de l'ordre de 0,69 mg, ce qui correspond à 5,6% de la masse et au double de la perte de masse observée durant l'augmentation de la température. Il peut être observé que la perte de masse n'est pas linéaire et se décompose en 3 phases. La perte de masse totale pour l'ensemble de l'exposition à la chaleur pendant 4 jours à 160°C s'élève à 8,4%. Ce pourcentage est faible en comparaison de la valeur obtenue lors des mesures de perte de masse sur l'échantillon global (18,2%). Cette différence peut être expliquée par des variations d'humidité interne des échantillons non conditionnés avec une même humidité avant l'analyse. Il est également possible que les différences de format des échantillons favorisent cette différence d'hydratation. Dans le cas de l'analyse TGA, la masse d'échantillon analysée n'est que d'une dizaine de milligramme (12,3mg) contre une vingtaine de gramme (18,2g) dans le cas de l'échantillon de grande taille.

Bien que l'exposition à la chaleur pendant 4 jours à 160°C entraîne une perte de masse significative accompagnée d'une rigidification de l'échantillon tout au long de cette phase, aucune variation d'énergie n'est constatée au cours de l'isotherme. Ce phénomène pourrait indiquer que le matériau a atteint un état de « pseudo-équilibre ». La déshydratation du cuir conséquence de l'exposition à la chaleur va favoriser la formation d'interactions de faible énergie et liaisons covalentes. Ce phénomène accompagné de la fusion des zones cristallines vont être la conséquence d'une augmentation de la rigidité de l'échantillon.

Au vu du profil ATD, il semblerait que ces phénomènes se déroulent principalement lors de la phase de montée en température, le signal obtenu étant stable au cours de l'isotherme il pourrait être indicateur d'un équilibre réactionnel.

### Conclusion et discussion

Grâce aux analyses mécaniques, la perception au toucher de l'augmentation de la rigidité des échantillons après exposition à la chaleur a pu être quantifiée. Le phénomène de rigidification peut être considéré comme corrélé à la déshydratation de l'échantillon, au cours de laquelle, la phase « mobile » s'évapore, les molécules se rapprochent, la structure devient compacte et induit la formation de nouvelles interactions intermoléculaires. Au vu du profil ATD, il semblerait que ces réactions aient lieu principalement au début de la phase d'augmentation de température. Ces phénomènes sont dépendants de la température et du temps d'exposition et observables également dans le cas des cuirs de tannage au sumac.

## Conclusion générale de la première partie : caractérisations physicochimiques et biochimiques des changements engendrés sur les cuirs par l'exposition à la chaleur

L'ensemble des techniques d'analyse utilisées pour caractériser les effets de l'exposition des cuirs à la chaleur nous ont permis d'obtenir des informations aussi bien à des échelles macroscopiques que microscopiques. Les analyses réalisées lors de cette étude ont mis en évidence de manière systématique les effets de l'exposition à une chaleur sèche sur des échantillons modèles.

L'impact de la température et du temps d'exposition ont pu être étudiés sur différents échantillons exposés à la chaleur dans le cadre de trois conditions différentes (4 jours 100°C, 25 heures 160°C, 4 jours 160°C).

Les différentes techniques d'analyse, aussi bien physico-chimique que biochimique ont permis l'obtention de résultats complémentaires et cohérents entre eux. Ils mettent en évidence des changements progressifs et profonds de la structure des cuirs lors de l'exposition à la chaleur selon des conditions appliquées. Ces modifications dont la plupart ont lieu à une échelle moléculaire ont de graves répercussions à l'échelle macroscopique, tel que l'apparition d'un brunissement par réaction de Maillard.

Nous proposons un schéma bilan (**Figure 76** et **Figure 77**) illustrant les principales modifications induites par la chaleur sèche sur la molécule de collagène. Ce schéma repose sur les résultats de cette recherche, combinés aux données tirées de la littérature.

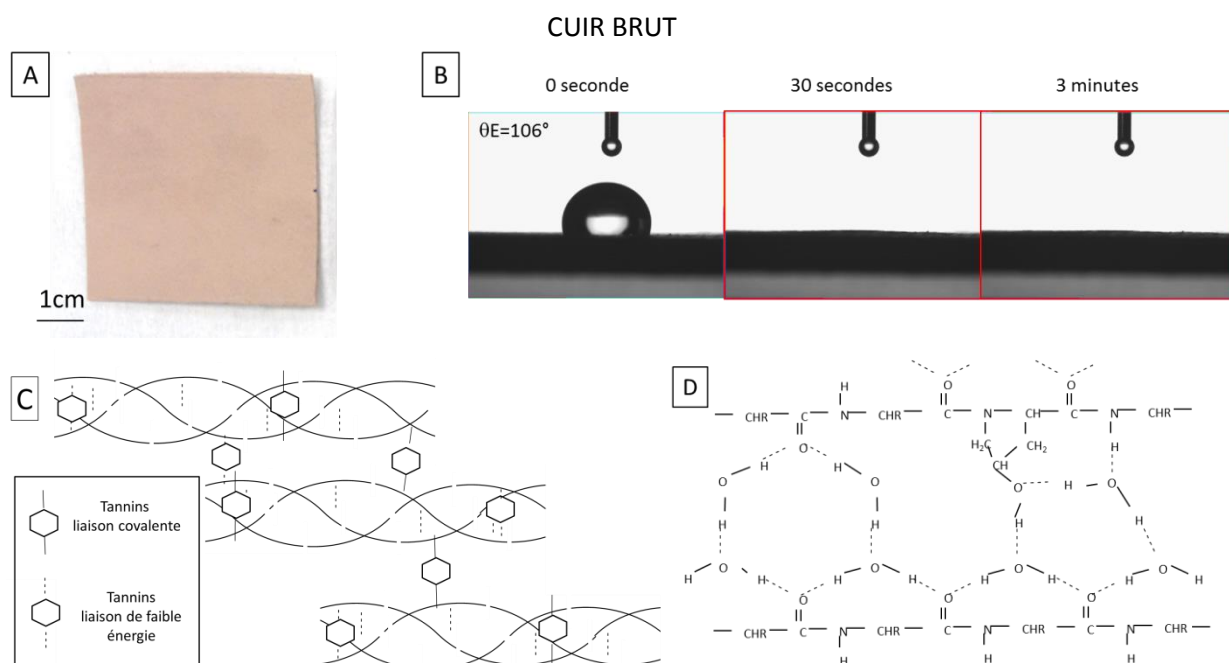
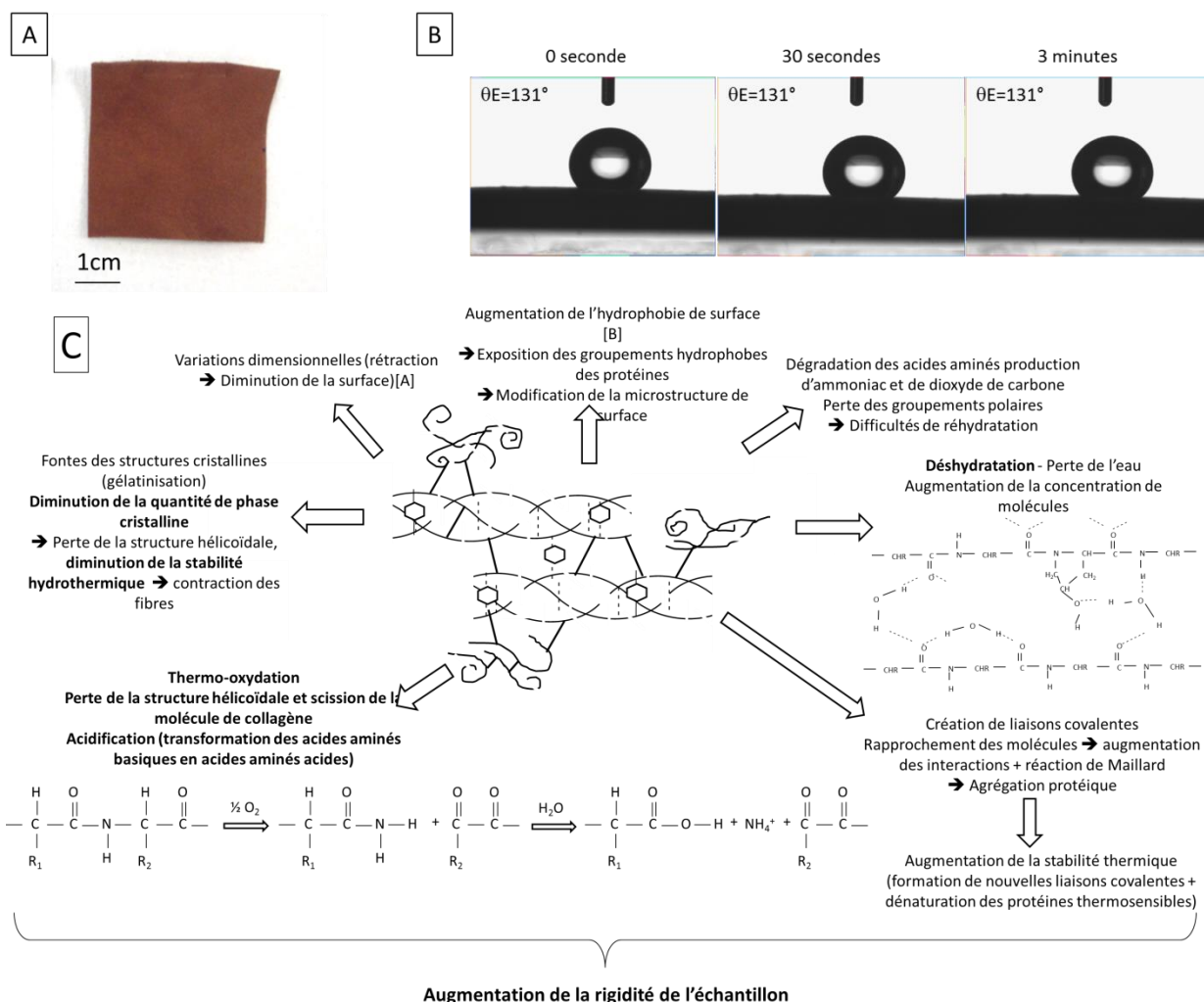


Figure 76 : [A]-[D] Etat d'un cuir brut à différentes échelles structurales. [A] Observations macroscopiques d'un cuir brut (couleur et dimensions). [B] Propriétés de surface d'un cuir brut déterminées par mesure d'angles de contact et mouillabilité. [C] Schéma de l'état de molécules de collagène au sein d'un cuir brut. [D] Schéma de la formation de liaisons hydrogènes au sein de la triple hélice grâce aux molécules d'eau.

# CUIR EXPOSE A UNE CHALEUR SECHE



**Figure 77 :** [A]-[C] Etat d'un cuir exposé à une chaleur sèche à différentes échelles structurales. [A] Observations macroscopiques d'un cuir après exposition à la chaleur (couleur et dimensions). [B] Propriétés de surface d'un cuir exposé à la chaleur déterminées par mesure d'angles de contact et mouillabilité. [C] Schéma de l'état de molécules de collagène au sein d'un cuir chauffé et impacts à l'échelle moléculaire.

Les différentes études réalisées ont mis en évidence des phénomènes d'altération comparables à ceux décrits dans la littérature dans le cas d'études de cuirs historiques (phénomènes en gras sur la **Figure 77**: oxydation, diminution de la part de zones cristallines, diminution de la stabilité hydrothermique, augmentation de la rigidité...). Ces résultats confirment que la chaleur notamment sèche peut être utilisée dans un processus de vieillissement accéléré afin de modéliser les effets du temps.

L'ensemble des modifications observées dans le cas des échantillons exposés à la chaleur (déshydratation, rétraction, acidification, fonte et diminution de la part de fractions cristallines, augmentation de l'hydrophobie, perte des capacités d'hydratation, augmentation de la stabilité

thermique, baisse de la stabilité hydrothermique...) peuvent participer à la perte de souplesse du matériau, impossible à solliciter mécaniquement.

La deuxième étape de notre travail consiste à proposer un support pour la restauration des échantillons exposés à la chaleur dans le but de leur restituer au moins une partie de leur propriétés de souplesse. L'objectif était de développer une approche de restauration basée sur l'utilisation de molécule biologique de type enzyme.

A l'aide des études précédentes ainsi que des résultats obtenus lors de cette caractérisation des effets de l'exposition d'un cuir à une chaleur sèche, il peut être supposé que l'exposition à la chaleur induit deux phénomènes d'altération distincts. D'une part elle provoquerait une désorganisation au niveau de la structure des molécules de collagène et d'autre part elle entrainerait la formation de nouvelles liaisons stabilisatrices.

Il paraît très difficile, voire impossible de redonner aux constituants du cuir leur structure et propriétés physico-chimiques originelles quelque soit le traitement envisagé. En revanche il paraît davantage réalisable d'essayer de contrer les conséquences de la formation des nouvelles liaisons covalentes par l'utilisation d'enzymes de type protéase afin de rompre les agrégats protéiques néoformés, comme illustré dans la figure ci-dessous (**Figure 78**).

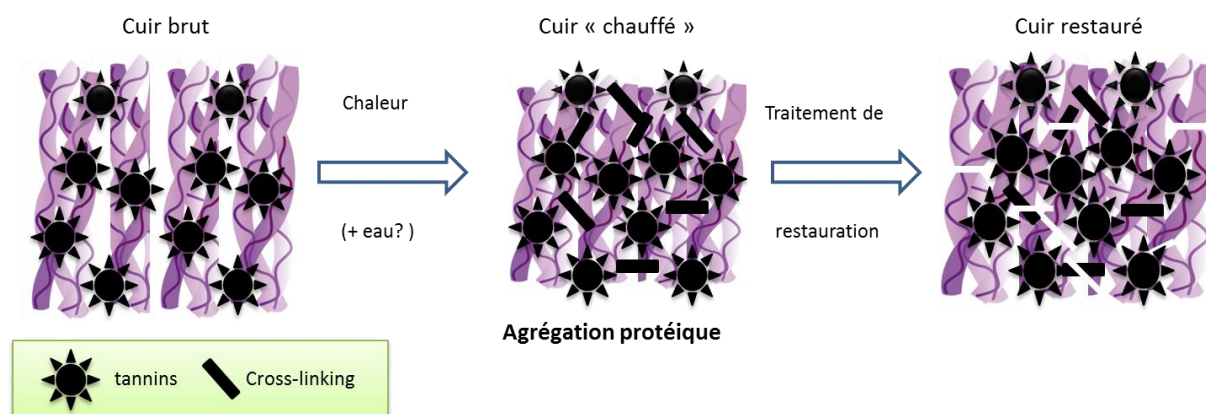


Figure 78 : Illustration de l'hypothèse des effets de la chaleur et stratégie de restauration utilisant une protéase dans le but de rompre les agrégats protéique néoformés lors de l'exposition à la chaleur.



## **PARTIE 2 : STRATEGIE DE RESTAURATION PAR VOIE ENZYMATIQUE**

L'exposition des cuirs à la chaleur engendre principalement une rigidification, dont l'origine tient à la formation d'agrégats protéiques comme cela a été démontré précédemment. L'objectif de la restauration est de redonner de la souplesse au cuir, pour cela la stratégie envisagée dans cette partie repose sur l'utilisation de protéases, par analogie avec le processus physiologique de réparation des brûlures. Ces enzymes doivent en théorie rompre les agrégats protéiques, responsables de la rigidification des cuirs, en vue de restituer leurs propriétés de souplesse.

Lors de la caractérisation des effets de la chaleur, des résultats similaires ont été obtenus sur les cuirs mimosa et sumac, aussi une partie des essais de restauration ont été entrepris sur des cuirs de tannage au sumac, celui-ci ayant été mieux caractérisé au début de l'étude.

### **A. Développement d'un support pour l'application d'un traitement de restauration enzymatique**

La mise en œuvre d'un traitement à base d'enzymes nécessite une étape préalable de choix du support de la protéase. En effet, nous avons montré que les cuirs exposés à la chaleur sont hydrophobes, non mouillables et peu hydratés. Ces propriétés ne sont pas compatibles avec une réaction enzymatique.

Les études fondamentales en enzymologie ont montré que les enzymes ne peuvent assurer la catalyse que lorsque de l'eau est disponible pour les transferts et la dynamique structurale des molécules. Cette disponibilité de l'eau est indiquée par l'activité thermodynamique de l'eau. L'activité thermodynamique de l'eau ( $a_w$ ) d'un matériau est proportionnelle au rapport entre la pression de vapeur d'eau  $P_{wm}$  du matériau m et la pression de vapeur de l'eau pure à la température T du matériau  $P_{w0}(T)$  :  $a_w = P_{wm}/(P_{w0}(T))$

L' $a_w$  indique l'état de l'eau et permet d'estimer la part d'eau libre, c'est-à-dire disponible au sein d'un matériau/produit. Sa valeur est comprise entre 0 et 1, plus la valeur est élevée, plus il y a d'eau libre dans le matériau, disponible pour des réactions.

La réaction enzymatique a lieu lorsqu'un seuil minimal d' $a_w$  est atteint (Poole 1994).

La valeur de ce seuil est propre à chaque enzyme et dépend de sa structure tridimensionnelle, du type de réaction catalysée, de la nature du substrat et du milieu réactionnel. Cette considération est à l'origine du concept de « medium engineering » pour les enzymes utilisées en milieux non – conventionnels (Tramper et al. 1992).

Les cuirs soumis à la chaleur étant très peu hydratés, la mobilité moléculaire au sein du cuir sera donc très faible. Afin d'assurer l'expression de son activité, le milieu réactionnel ou le support de l'enzyme devra impérativement contenir de l'eau. Un des défis de cette stratégie de restauration est d'apporter l'eau nécessaire à l'activité enzymatique sachant que l'eau a un effet délétère sur les cuirs

et en particulier sur les cuirs ayant été chauffés. Il faut donc mettre au point une approche capable d'apporter de l'eau sans que celle-ci soit néfaste pour le cuir. La première étape de ces travaux a été de tester différents supports pour l'enzyme en les appliquant sur cuirs bruts ou chauffés 4 jours à 160°C.

## I. SOLUTION ENZYMATIQUE

Comme discuté précédemment, le contact direct entre un cuir altéré par la chaleur et l'eau est à proscrire car il provoque une rétraction supplémentaire du matériau.

Néanmoins des essais de restauration en solution aqueuse ont été entrepris afin d'évaluer si l'apport d'une enzyme en solution peut contrecarrer les effets néfastes de l'eau sur les cuirs. Une solution aqueuse ou tamponnée à 37°C constitue un milieu idéal pour l'activité de l'enzyme car elle présente une activité de l'eau très élevée (>0,95). Cette méthode ne pourrait s'avérer efficace que si la réaction enzymatique est plus rapide que celle qui provoque la dégradation par l'eau.

Différentes solutions enzymatiques contenant une protéase, la collagénase, ont été testées. Elles constituent des milieux réactionnels plus ou moins favorables pour l'activité de l'enzyme. Le milieu le plus favorable pour l'enzyme est préparé à partir d'une solution tampon d'HEPES pH8 et est additionnée de chlorure de calcium qui joue un rôle de cofacteur pour la protéase. Le milieu le moins favorable est constitué d'eau désionisée. Les milieux préparés à partir d'eau seront dénommés « solution aqueuse », ceux à partir de la solution d'HEPES « solution tamponnée ». La concentration maximale en enzyme testée est de 10U/mL. Les résultats obtenus en fonction du milieu réactionnel (solution aqueuse ou tamponnée ± chlorure de calcium) pour une incubation pendant 24 heures à 37°C (température optimale) sont présentés en **Figure 79**.

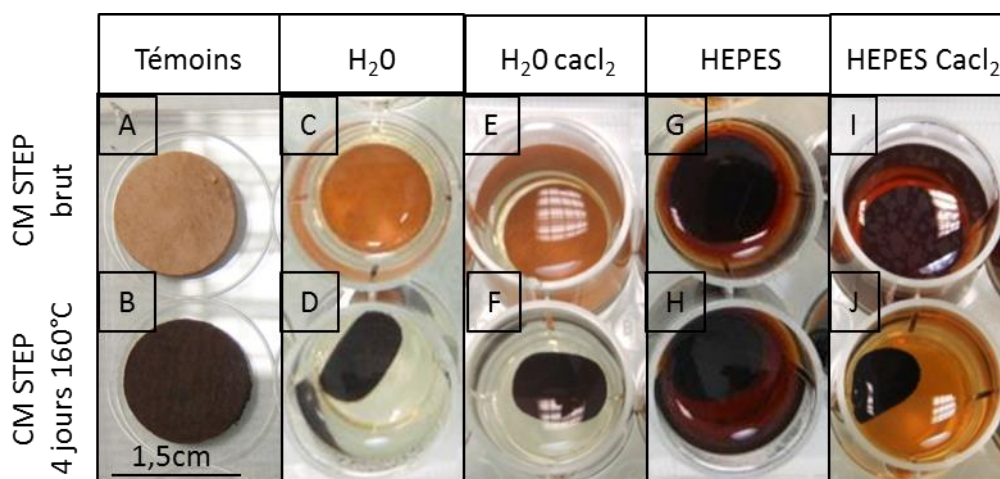


Figure 79 : Effet de l'incubation de cuirs de tannage au mimosa bruts et exposés à la chaleur dans différents milieux réactionnels additionnés de collagénase (eau ou HEPES +/- chlorure de calcium) pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect (dimension, coloration).

L'incubation des cuirs bruts, en solution aqueuse enzymatique avec [E] ou sans cofacteur[C] induit une légère coloration des échantillons. En solution tamponnée enzymatique avec [I] ou sans cofacteur [G], une coloration des échantillons de cuirs bruts plus prononcée est observée. Dans le cas

des cuirs chauffés [D], [F] et [H], [J] une très forte rétraction est constatée pour l'ensemble des conditions.

Par ailleurs, en milieu tamponné (HEPES), les solutions, limpides et transparentes au début de la réaction sont fortement colorées après vingt-quatre heures d'incubation à 37°C au contact des échantillons. La coloration est moins prononcée en présence de chlorure de calcium dans le cas du cuir chauffé. Des résultats similaires sont obtenus dans le cas des témoins ne contenant pas de collagénase.

L'observation macroscopique d'échantillons de cuir de tannage au sumac de taille plus importante (2x2cm) après traitement enzymatique a révélé que les phénomènes décrits étaient accompagnés d'une augmentation de l'épaisseur des échantillons, notamment dans le cas de l'échantillon de cuir sumac –A chauffé 4 jours à 160°C (CS-A 4 jours 160°C).

Les effets observés sont dépendants de l'échantillon de cuir, ils sont plus marqués dans le cas du cuir CS-A 4 jours 160°C que pour le CS-C 4 jours 160°C alors que les traitements thermiques et enzymatiques sont les mêmes. Par ailleurs, l'épaisseur augmente avec la concentration d'enzyme.

L'ensemble de ces résultats montrent que même dans des conditions optimales de température, de pH et en présence de cofacteur, l'enzyme ne parvient pas à redonner aux cuirs ses propriétés, ni à compenser les effets néfastes de l'eau.

Il apparaît primordial de limiter au maximum le contact direct entre la phase aqueuse contenant l'enzyme et le cuir. Dans cette optique, une nouvelle stratégie se basant sur l'utilisation de gels a été développée.

## II. GELS ENZYMATIQUES

Un gel est constitué d'un réseau solide élastique continu qui contient une phase liquide et l'empêche de s'écouler. La formation d'un réseau protéique ou polysaccharidique sous forme de gel permet donc l'immobilisation de l'eau au sein du réseau. Il est de plus possible d'inclure au sein d'un hydrogel, dans sa phase aqueuse, des molécules hydrophiles qui peuvent être ensuite délivrées selon une cinétique contrôlée.

L'utilisation de gel enzymatique renfermant une protéase est un procédé utilisé dans le cas des traitements des brûlures. Ils permettent un relargage progressif et contrôlé d'enzymes protéolytiques, permettant un débridement des zones nécrosées moins agressif que par les gestes chirurgicaux (EMA 2012). Une stratégie similaire a été adoptée dans un deuxième temps lors de notre étude sur les cuirs chauffés. Deux types de gels enzymatiques ont été testés, le premier est composé d'une matrice de polysaccharide, le second d'une matrice protéique.

## II.1. GELS POLYSACCHARIDIQUES ENZYMATIQUE

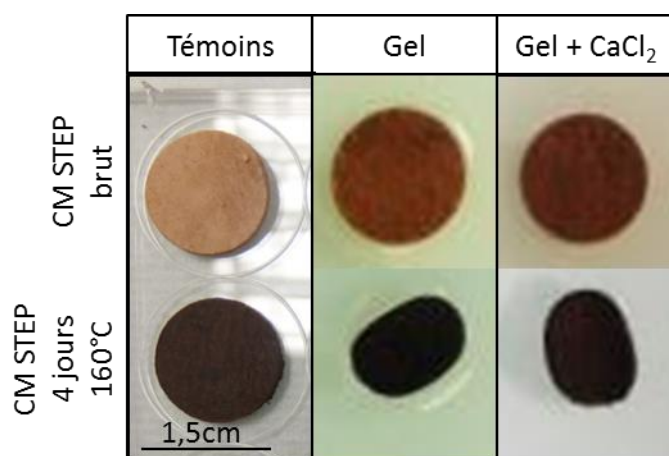
L'idée développée ici est d'inclure une protéase au sein d'un gel d'agar. La préparation du gel nécessite une augmentation de la température importante ( $T^{\circ}\text{C}$  fusion :  $90^{\circ}\text{C}$ ,  $T^{\circ}\text{C}$  gélification :  $40^{\circ}\text{C}$  environ). L'enzyme doit être introduite avant que la température n'atteigne le point de gel. Il est donc nécessaire d'utiliser une protéase thermostable. Notre choix s'est porté sur la thermolysine, protéase thermostable peu spécifique dont le pH optimum est de 8, sa température optimale est de  $70^{\circ}\text{C}$  et ses cofacteurs sont le zinc et le calcium.

Un tel gel est fortement hydraté, l'eau (phase liquide) et le réseau (phase solide) ne sont pas liés l'un à l'autre ; l'eau contenue dans le gel est donc physiquement contrainte mais possède les propriétés thermodynamiques et donc réactionnelles de l'eau libre ou faiblement liée. Un gel de polysaccharide constitue donc un milieu adapté à l'inclusion d'une protéase. Cette méthode permet d'éviter l'immersion de l'échantillon au sein de la phase aqueuse tout en assurant à l'enzyme des conditions réactionnelles correctes.

Différents gels polysaccharidiques (agar 0,5% m/V) enzymatiques, préparés à l'aide de milieux réactionnels plus ou moins favorables pour l'activité de la thermolysine, ont été testés.

Comme précédemment le milieu le plus favorable pour l'enzyme est préparé à partir d'une solution tampon d'HEPES pH8 additionnée de chlorure de calcium auquel l'agar est ajouté. Le milieu le moins favorable est préparé à partir d'eau déionisée à laquelle est ajouté l'agar. Les gels d'agar préparés à base d'eau seront appelés gels aqueux, ceux à base d'HEPES, gels tamponnés. La concentration maximale en enzyme testée est de 10U/mL.

Les expériences ont été entreprises sur le cuir mimosa STEP, les résultats obtenus après une incubation de 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$  sont présentés en **Figure 80** dans le cas des gels aqueux et en **Figure 81** pour les gels tamponnés.



*Figure 80 : Effet de l'incubation de cuirs bruts mimosa STEP (CM STEP) et exposés à la chaleur au contact de gels polysaccharidiques aqueux renfermant de la thermolysine (eau +/- chlorure de calcium) pendant 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$  sur leur aspect (dimension, coloration).*

Le contact avec le gel aqueux enzymatique avec ou sans cofacteur induit une légère coloration des échantillons de cuir brut, conservée après séchage, mais aucune rétraction des échantillons n'est constatée. Dans le cas du cuir chauffé, une forte rétraction est constatée pour les deux conditions.

Bien que l'eau soit piégée au sein du gel polysaccharidique, elle provoque une rétraction des échantillons chauffés, néanmoins moins importante que lors des essais en solution (31% contre 43,6%).

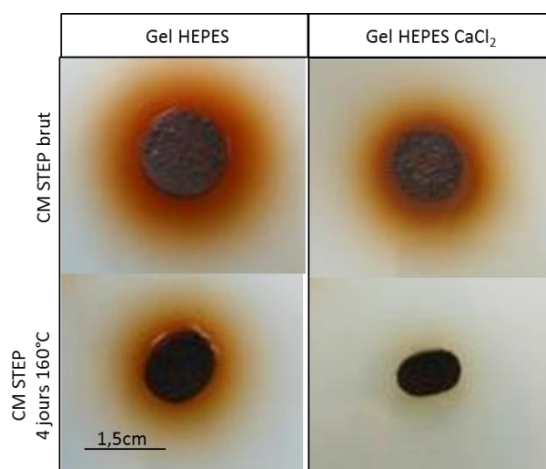


Figure 81 : Effet de l'incubation de cuirs bruts mimosa STEP (CM STEP) et exposés à la chaleur au contact de gels polysaccharidiques préparés à base d'HEPES et renfermant de la thermolysine (HEPES +/- chlorure de calcium) pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect (dimension, coloration).

L'utilisation d'un gel tamponné enzymatique n'améliore pas les résultats. Une coloration des cuirs bruts et une forte rétraction des cuirs chauffés sont observées. Bien que le milieu réactionnel soit plus favorable à une activité de l'enzyme, elle ne parvient pas à contrecarrer, ni même à réduire les effets néfastes de l'eau sur les cuirs chauffés.

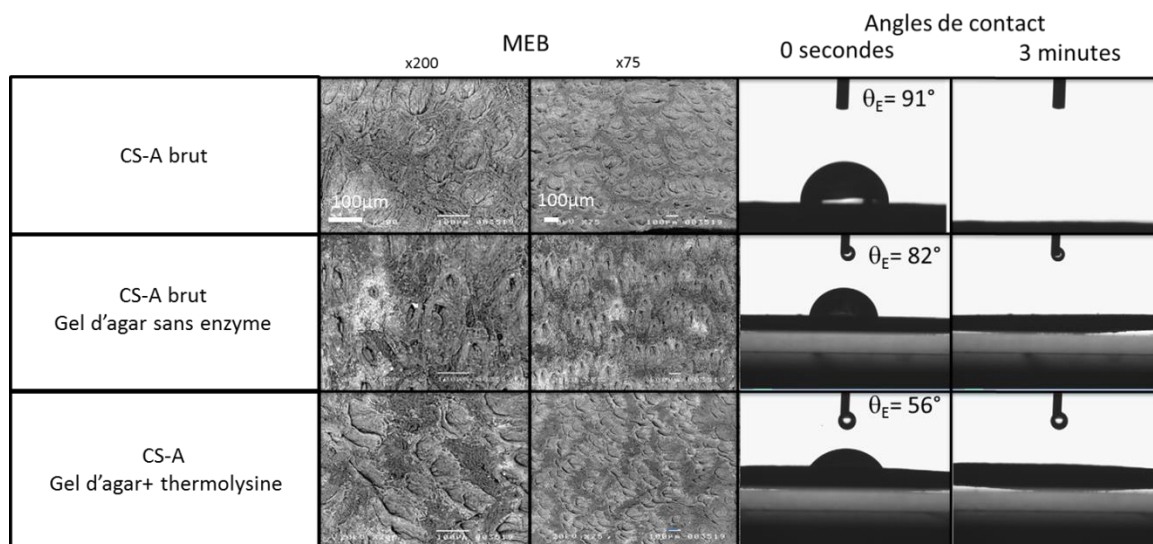
Après 24 heures d'incubation à 37°C, le milieu réactionnel est fortement coloré et on observe un halo de diffusion autour des échantillons. La diffusion est plus étendue dans le cas du gel enzymatique sans cofacteur (0,85cm contre 0,58cm). Une coloration des milieux contenant de l'HEPES avait également été observée dans le cas des solutions enzymatiques.

Une expérience complémentaire qui a consisté à déposer quelques gouttes de colorant en surface du gel d'agar additionné ou non de chlorure de calcium a montré que la présence de chlorure de calcium au sein des gels ne modifie ni la cinétique, ni les capacités de diffusion d'un colorant au sein de gels d'agar. Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'alcalinisation d'une solution obtenue par immersion d'échantillon de cuir dans de l'eau a un impact sur la couleur de la solution. La solution transparente et limpide se colore en brun lors de l'augmentation de pH (par ajout d'hydroxyde de sodium). Le changement de pH révèle la présence de molécules chromophores qui deviennent visibles à l'œil nu à pH basique. Une étude réalisée par Ongoka *et al.* a montré que les tannins (de type quinone, polyphénols, anthocyanes, flavonoïdes) sont sensibles au pH et constituent des indicateurs colorés naturels de pH (Ongoka et al. 2007). La coloration du milieu réactionnel à pH basique pourrait donc être attribuée aux tannins.

Compte tenu de cette information, il a été choisi pour la suite de l'étude de ne travailler qu'avec des traitements à base d'eau (milieux non alcalins), bien qu'ils ne constituent pas un milieu réactionnel optimal pour l'action de l'enzyme, afin d'éviter toute sur-coloration des échantillons.

Des résultats identiques ont été obtenus dans le cas de l'étude des cuirs de tannage au sumac. L'activité de l'enzyme ne permet pas de réduire les effets néfastes de l'eau sur les cuirs chauffés.

La caractérisation des effets du traitement sur la morphologie et les propriétés de surface a été réalisée par microscopie électronique à balayage et mesures d'angles de contact. Les résultats obtenus dans le cas du cuir brut sumac STEP (CS) sont présentés dans la figure ci-dessous (**Figure 82**).



*Figure 82 : Effet de l'incubation de cuirs sumac bruts au contact de gels d'agar enzymatiques préparés à partir d'eau+/- chlorure de calcium pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect la morphologie et les propriétés de surface.*

Après application du traitement gel d'agar sans thermolysine, la surface du cuir brut est modifiée, les pores semblent contractés. Par ailleurs comme en témoignent les valeurs d'angles de contact inférieures à 90°, le contact avec le gel modifie les propriétés de surface en rendant le cuir un peu plus hydrophile. Après application du traitement enzymatique, la surface du cuir est plus fortement modifiée, la taille des pores est plus importante, elle passe d'environ 40 à 70µm. La surface de l'échantillon semble abrasée et ressemble davantage à celle du cuir brut. L'application du gel non enzymatique ne permet pas un tel résultat. La présence d'enzyme exacerbe les propriétés d'hydrophilie (56°). En abrasant la surface, l'enzyme pourrait modifier sa morphologie et ses propriétés. Ces observations montrent un effet de l'enzyme sur les propriétés de surface des cuirs.

Dans le cas du cuir chauffé, les résultats de l'application des traitements sont présentés dans la figure suivante (**Figure 83**).



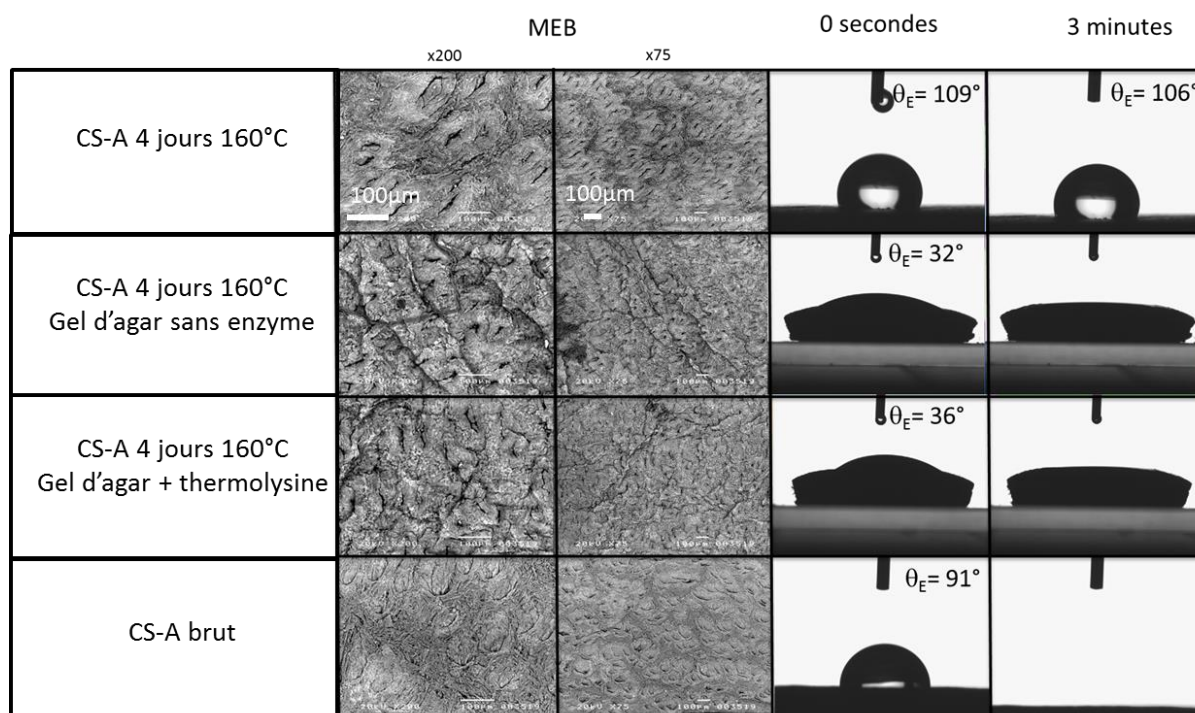


Figure 83 : Effet de l'incubation de cuirs sumac chauffés 4 jours à 160°C au contact de gels d'agar enzymatiques préparés à partir d'eau +/- chlorure de calcium pendant 24 heures à 37 °C sur leur aspect la morphologie est les propriétés de surface.

Les observations réalisées dans le cas des cuirs chauffés mettent également en évidence des modifications au niveau de la morphologie de surface et de leurs propriétés.

L'application du gel (avec ou sans enzyme) provoque une rétraction de la surface. Les propriétés de surface sont modifiées, le cuir chauffé devient très hydrophile et redevient mouillable après application des gels. Bien que la surface semble moins altérée dans le cas du traitement enzymatique, la présence de l'enzyme ne permet pas de redonner au cuir chauffé son aspect d'origine.

L'inclusion d'une protéase au sein du gel polysaccharidique impliquait le choix d'une enzyme thermostable. Celle choisie, la thermolysine, est une métalloprotéase capable d'hydrolyser la gélatine et le collagène dénaturé. Cependant, elle reconnaît les groupements hydrophobes, peu présents dans la molécule de collagène. Ses caractéristiques protéolytiques, non idéales pour hydrolyser le collagène, pourraient expliquer les effets peu prononcés de l'enzyme. Une partie des nouvelles propriétés des cuirs est attribuable au traitement en lui-même (cas des témoins). La présence de l'enzyme permet cependant d'améliorer les propriétés d'hydrophilie chez le cuir brut. Ces résultats peuvent être considérés comme encourageants, cependant, les phénomènes de rétraction, bien que limités par rapport à l'utilisation d'une solution d'enzymes, ne permettent pas d'envisager l'emploi d'un tel support pour le traitement des cuirs chauffés.

## II.2. GELS PROTEIQUES ENZYMATIQUES : GELS DE GELATINE CONTENANT UNE PROTEASE

Des gels protéiques enzymatiques constitués de liaisons faibles exclusivement ou réticulés avec des liaisons covalentes ont été testés. Ces essais sont basés sur une technologie développée au laboratoire ERRMECe (Giraudier et Larreta-Garde 2007). Un gel de protéines contenant une protéase est synthétisé. L'enzyme incluse permet la dégradation progressive du réseau de gel ce qui induit un relargage des molécules contenues dans le gel y compris de l'enzyme elle-même. Ce type de support devrait permettre une action de l'enzyme tout en limitant le contact entre le cuir et la phase aqueuse.

Deux types de gels enzymatiques, formés à partir de gélatine (5%*m/V*), ont été réalisés. Ils diffèrent par la structure de leur réseau solide. Les protéases incluses au sein du gel sont la collagénase, métalloprotéase spécifique du collagène ou l'Espérase®, sérine protéase aspécifique, toutes deux en très faible concentration (respectivement  $5 \times 10^{-5}$  U/mL et  $1,1 \times 10^{-3}$  U/mL).

Le premier type de gel est constitué d'un gel de gélatine incluant une protéase (collagénase ou Espérase®). Il est formé à température ambiante, puis placé à 4°C avant application sur les échantillons dans le but de favoriser la formation de triples hélices. Le gel ainsi obtenu, lié uniquement par des liaisons de faible énergie est dit physique. Il reste stable jusqu'à une température de l'ordre de 30°C, au-delà de laquelle il se liquéfie. L'application du gel protéique enzymatique sera réalisée à température ambiante afin de permettre une action de l'enzyme, qui serait limitée à 4°C, tout en gardant un support sous forme de gel, qui serait liquéfié à 37°C.

Le second type de gel contient de plus une enzyme de type liante : la transglutaminase (TG<sup>ase</sup>). La présence de cette enzyme permet la formation de liaisons iso-peptidiques entre les chaînes latérales des résidus lysine et glutamine de la gélatine. Un gel chimique, matrice de gélatine réticulée (liaisons covalentes) incluant la protéase (collagénase ou Espérase®) est obtenu. Ce gel est formé à 37°C, puis placé à 4°C avant application sur échantillons. Lors du passage au froid, un faible taux d'hélices est formé. Ce gel n'est pas réversible à la température. Ainsi l'application du gel protéique enzymatique incluant la TG<sup>ase</sup> pourra être réalisée à 37°C. Dans ces conditions, optimales pour l'activité de l'enzyme, le gel ne se liquéfiera pas. Deux conditions d'application seront testées, une à 37°C pour maximiser l'action de l'enzyme, l'autre témoin, sera réalisée à température ambiante.

La **Figure 84**, présente les résultats obtenus lors de l'application du gel de gélatine, incluant des protéases, à température ambiante. Les effets du traitement ont été observés aux échelles macroscopique et microscopique (MEB). La mesure des angles de contact renseigne sur les propriétés de surface après application du traitement.



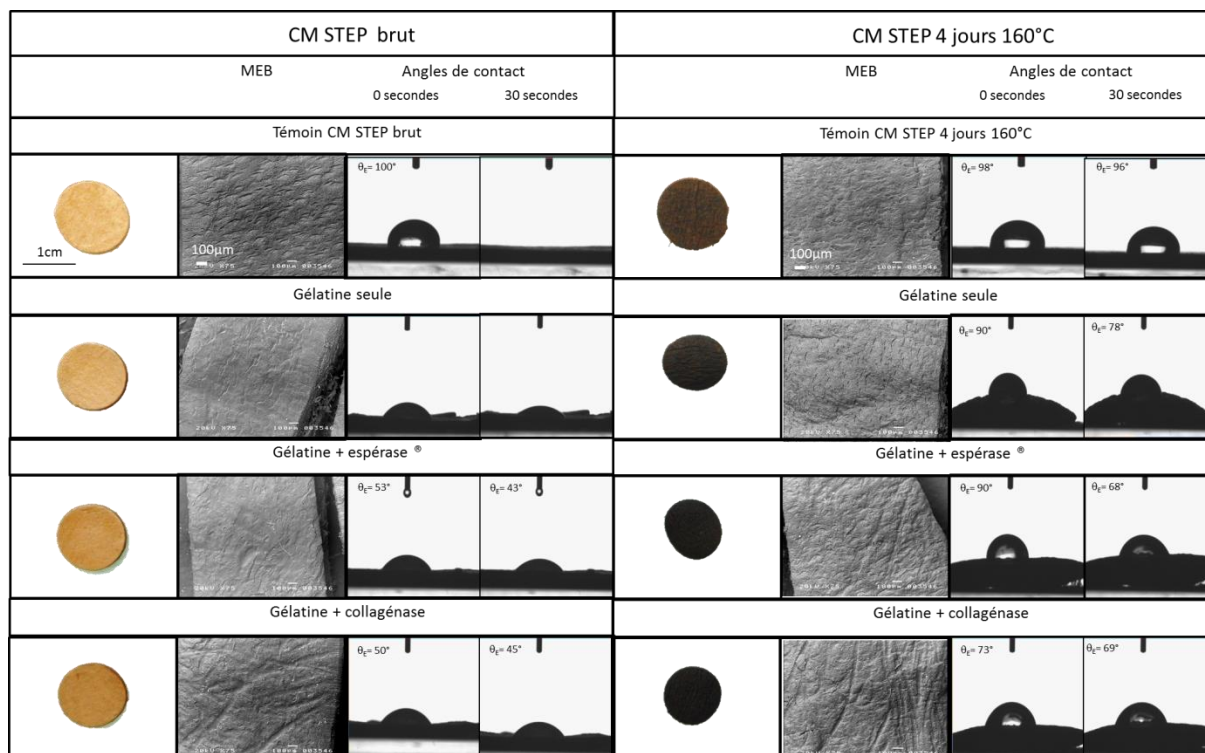


Figure 84 : Effet de l'application de gels de gélatine seuls ou additionnés de protéase (collagénase ou Espérase®) sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à température ambiante sur leur aspect général ainsi que sur la morphologie et les propriétés de surface.

Après 24 heures d'incubation à température ambiante au contact du gel de gélatine seul, des phénomènes de rétraction sont observés dans le cas des cuirs bruts et chauffés. Cette rétraction est cependant moins marquée que dans les essais précédents avec un pourcentage de rétraction maximal de 28% contre 31 et 43% respectivement dans le cas des gels polysaccharidiques et solutions enzymatiques. Visuellement, la morphologie de surface est peu modifiée en présence d'enzyme. L'application du traitement enzymatique rend le cuir brut moins mouillable mais hydrophile. Cela pourrait être attribuable à la présence d'un mince film de gélatine en surface du cuir. Les cuirs chauffés restent hydrophobes et non mouillables.

Dans ces conditions les effets des gels enzymatiques semblent limités. Afin d'optimiser l'action de l'enzyme, l'application de gel de gélatine réticulé (TG<sup>ase</sup>) incluant une protéase a été entreprise. Les effets des traitements sont observés au niveau de la surface à l'échelle macroscopique et microscopique après 24 heures d'incubation à 37°C. Les résultats sont présentés en **Figure 85**.

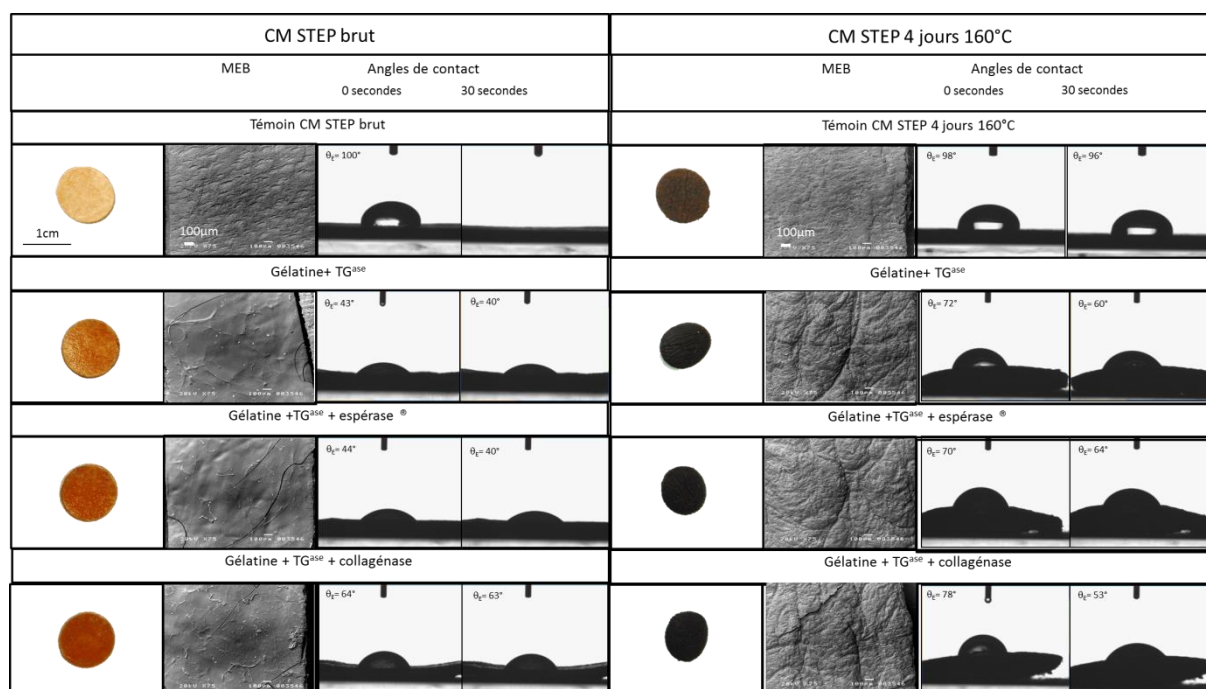


Figure 85 : Effet de l'application de gels de gélatine + transglutaminase additionnés ou non de protéase (collagénase ou Espérase®) sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C sur leur aspect général ainsi que sur la morphologie et les propriétés de surface.

Après 24 heures de contact à 37°C avec les gels de gélatine réticulés par la transglutaminase l'échantillon de cuir brut présente un aspect brillant et sa couleur a été modifiée. L'étude à une échelle microscopique révèle une surface comme lissée et devenue hydrophile, cependant, la cinétique de pénétration de la goutte au sein du matériau est ralentie Ceci pourrait être dû à la présence d'un dépôt de gélatine en surface.

Dans le cas des cuirs chauffés, une rétraction est observable. L'étude de surface met en évidence des modifications au niveau de la morphologie et des propriétés. La surface est comme plissée et le cuir devient hydrophile.

La présence d'enzyme (collagénase ou Espérase®) ne semble pas induire de modifications significatives.

Bien que placée dans des conditions plus optimales pour son activité (température de 37°C), les effets de l'enzyme sont peu visibles. Les variations observées pouvant être attribuées au support de gélatine réticulée en lui-même. Par ailleurs, les observations des cuirs chauffés mettent en évidence une rétraction plus forte que dans le cas des tests avec gels de gélatine et protéase. Afin de voir si cette rétraction était moins importante lorsque l'application est réalisée à température ambiante, l'application a été faite dans ces conditions. Les effets du traitement sont observés après 24 heures d'incubation. Les résultats sont présentés en **Figure 86**.

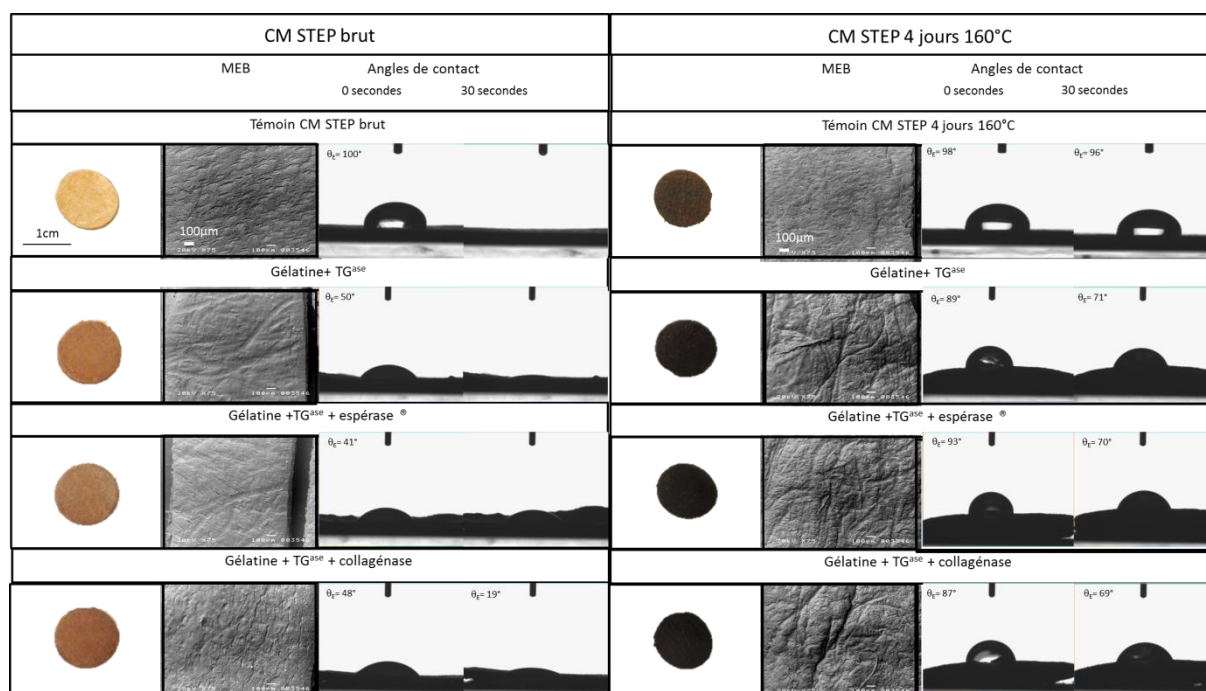


Figure 86 : Effet de l'application de gels de gélatine + transglutaminase additionnés ou non de protéase (collagénase ou Espérase<sup>®</sup>) sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à température ambiante sur leur aspect général ainsi que sur la morphologie et les propriétés de surface.

Les résultats obtenus dans le cas de l'application de gels de gélatine réticulés à température ambiante sont différents de ceux à 37°C.

Dans le cas du cuir brut le contact du gel induit une coloration des échantillons sans rétraction. Les échantillons deviennent hydrophiles. Les résultats sont peu différents en présence d'une protéase (Espérase<sup>®</sup> ou collagénase).

Dans le cas des cuirs chauffés, le phénomène de rétraction est diminué par rapport au cas de l'application à 37°C (28 contre 46% de rétraction) et l'hydrophobie est légèrement réduite.

Les résultats obtenus mettent en évidence une rétraction des échantillons plus marquée dans le cas de l'incubation à 37°C et après chauffage.

L'ensemble des résultats ne mettent pas en évidence d'effets des protéases ; la faible concentration en enzyme ( $5 \times 10^{-5}$  U/mL pour la collagénase et  $1,1 \times 10^{-3}$  U/mL pour l'Espérase<sup>®</sup>), relarguée progressivement au cours du temps, n'est certainement pas suffisante pour observer un effet. L'augmentation significative de la concentration en protéase n'est pas possible dans un tel système car il causerait une liquéfaction de la matrice du gel protéique par dégradation. La limitation de contact entre le cuir et la phase aqueuse, nécessaire pour la préservation du cuir, ne serait pas respectée.

Il apparaît impératif de limiter encore davantage le contact entre la phase aqueuse et les échantillons, tout en augmentant les concentrations en enzyme.

Une nouvelle stratégie basée sur l'utilisation de composés dépresseurs d'activité thermodynamique de l'eau a été développée.

### III. SOLUTION AQUEUSE CONTENANT UN CO-SOLVANT DEPRESSEUR D'ACTIVITE THERMODYNAMIQUE DE L'EAU.

Afin de réduire la part d'eau libre, deux méthodes existent : la déshydratation et l'ajout d'agents dépresseurs.

Dans notre étude, afin de limiter le contact entre le cuir et l'eau contenue au sein du support de l'enzyme, un agent dépresseur d'activité de l'eau a été introduit.

Le choix s'est porté sur le glycérol, un co-solvant hydrosoluble, fort dépresseur d'activité thermodynamique de l'eau. Le glycérol est un polyol de faible masse ( $PM = 92$ ), liquide et infiniment miscible à l'eau ; il peut donc être utilisé à fortes concentrations. Il permet de limiter les interactions entre l'eau libre et les échantillons en diminuant sa concentration. En effet, pour 1M de glycérol la valeur d'activité de l'eau est de 0,96 ; elle diminue pour atteindre 0,61 dans le cas d'une solution contenant 10M de glycérol (Marcolli et Peter 2005).

Dans le cas de nos essais, l'enzyme est dissoute dans un mélange eau-glycérol. La protéase est introduite dans la phase aqueuse avant mélange au co-solvant.

Les essais de restauration ont été réalisés à 37°C pour optimiser l'action de l'enzyme, l'Esperase®. Le choix de cette enzyme est principalement basé sur son mode de conditionnement, sous forme liquide, permettant une inclusion plus facile au sein du milieu. Différentes concentrations en co-solvant ont été testées. Le glycérol ne constitue pas un milieu adapté pour l'action de l'enzyme, ainsi, afin de maximiser son effet, la concentration en enzyme a été très largement augmentée. Elle sera de 150U/mL pour l'ensemble des essais. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (**Figure 87**).

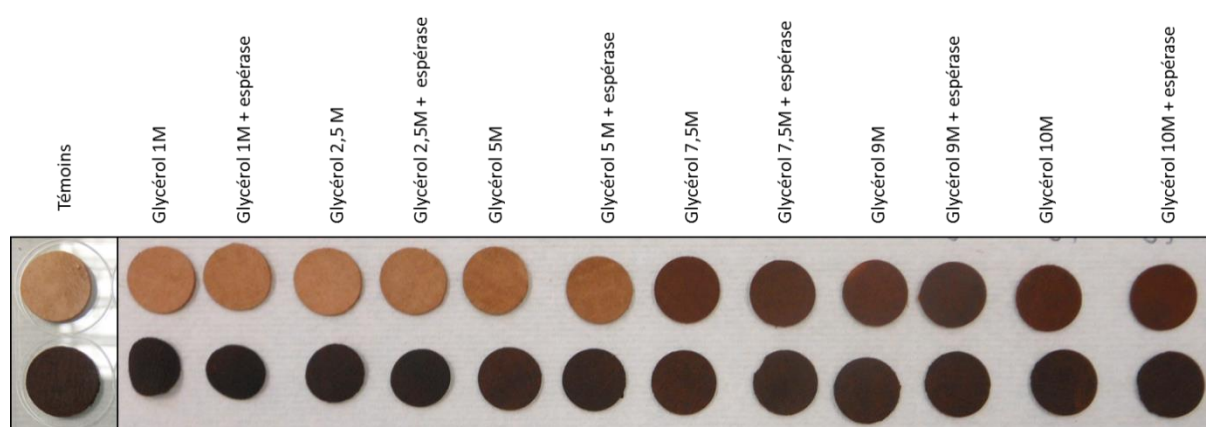


Figure 87 : Effet de l'application d'une solution enzymatique contenant différentes concentrations de glycérol sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C sur leur aspect général.

L'utilisation de faibles concentrations de glycérol (1 à 5M), impliquant une proportion en eau plus importante, n'induit aucune coloration des échantillons de cuir brut mais génère une rétraction des cuirs chauffés. Cette rétraction, de l'ordre de 10% pour la concentration 5M de glycérol, est cependant moins importante que dans le cas des essais en solution et avec gels enzymatiques.

L'augmentation de la concentration en glycérol provoque une coloration des échantillons de cuir brut mais permet de limiter les phénomènes de rétraction sur les cuirs chauffés, voire de les éviter, pour les concentrations en glycérol comprises entre 7,5 et 10 M. A ces concentrations, le glycérol limite fortement l'interaction entre l'eau libre et le cuir chauffé, ne provoquant pas sa rétraction. La contrepartie de ce phénomène est une diminution importante de l'activité enzymatique. Dans le cas

d'une protéase telle que l'Esperase®, l'activité enzymatique est abaissée de 35% pour une concentration en glycérol de 1M et cette baisse atteint 99% à 9M de glycérol (Hertmanni et al. 1991).

L'observation des solutions après 24 heures de contact avec les différents échantillons révèle une coloration de l'ensemble des solutions dans le cas des cuirs bruts. Ceci est le signe d'une diffusion de molécules colorées depuis le cuir. Aucune différence notable de coloration n'est observée entre solutions enzymatiques et non enzymatiques.

Après exposition à la chaleur aucune coloration n'est perceptible lors de l'utilisation de solutions sans enzyme. Les molécules colorées n'arrivent plus à diffuser. L'exposition à la chaleur bloque le phénomène de diffusion. Ce résultat conforte l'hypothèse d'agrégation des composants du cuir après exposition à la chaleur. En présence d'enzyme, une légère coloration des solutions est observable. L'enzyme permet une diffusion *de novo* des molécules colorées. La diffusion est cependant nettement moins prononcée que dans le cas des cuirs bruts. Cf **Figure 88**.

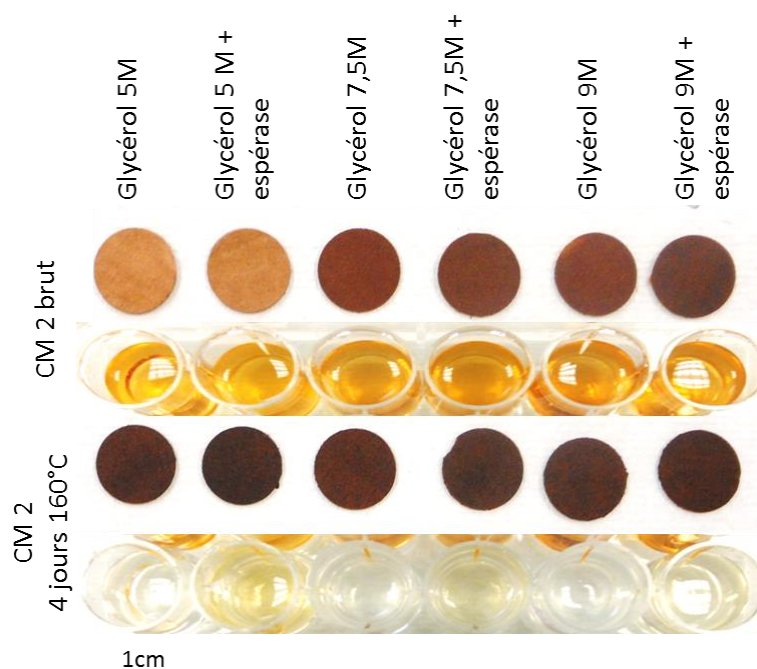


Figure 88 : Observation de la coloration des solutions enzymatiques contenant différentes concentrations de glycérol sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C.

La diffusion de molécules colorées est d'autant plus importante que la concentration en glycérol est faible (diffusion plus forte à 5 qu'à 9M de glycérol) ce qui conforte l'hypothèse d'une baisse importante de l'activité enzymatique en présence de fortes concentrations de glycérol.

L'enzyme contribue à la diffusion de molécules colorées depuis l'intérieur vers l'extérieur du matériau.

Afin de voir si l'enzyme permet aux cuirs de retrouver leurs capacités d'hydratation, c'est-à-dire la capacité de laisser diffuser de l'eau depuis l'extérieur vers l'intérieur du matériau, une mesure des capacités d'absorption d'eau a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 89**.

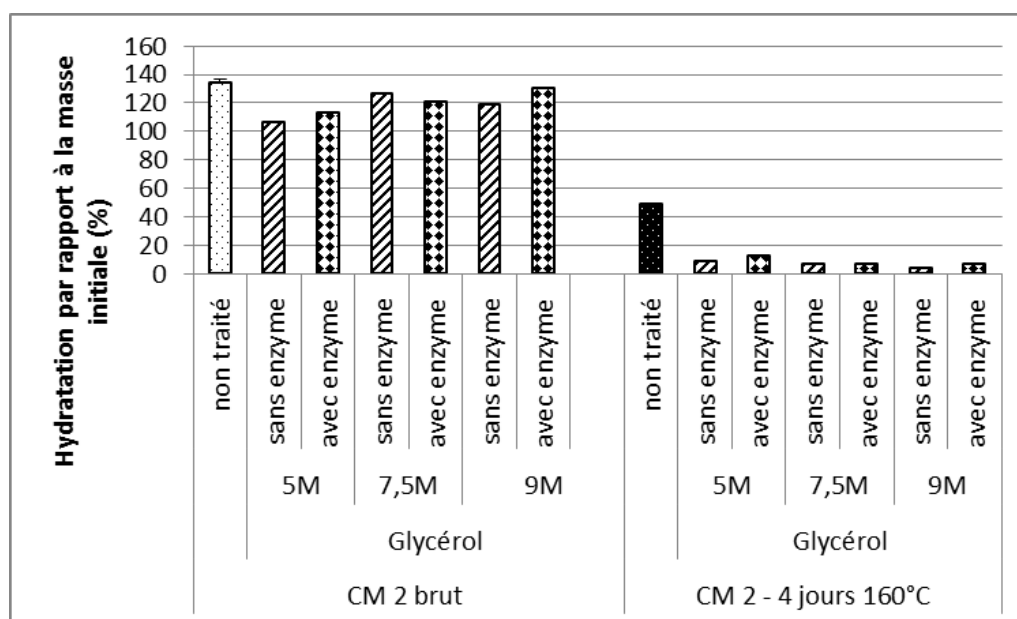


Figure 89 : effet de l'application d'une solution enzymatique contenant différentes concentrations de co-solvant sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à 37°C sur les capacités d'absorption d'eau des échantillons.

Le traitement glycérol avec ou sans enzyme ne permet pas aux échantillons de cuir brut d'augmenter leur capacités d'absorption d'eau, ni aux échantillons de cuirs chauffés de retrouver une capacité d'hydratation similaire à celle observée dans le cas du cuir brut.

Bien que les résultats précédents aient mis en évidence une action de l'enzyme même à forte concentration de glycérol, elle n'est pas suffisante pour redonner aux cuirs chauffés leurs propriétés initiales.

Le principal avantage de l'utilisation de forte concentration de glycérol repose sur l'absence de rétraction des échantillons de cuirs chauffés. Cependant à de telles concentrations, l'action de l'enzyme, bien que stimulée par le choix de la température d'incubation, est très limitée.

Une expérience complémentaire de comparaison de la stabilité hydrothermique de fibres de cuirs immergées dans de l'eau ou du glycérol nous a permis de comprendre l'origine de l'absence de rétraction lors de nos tests à forte concentration de glycérol. Les résultats présentés en **Figure 90** dans le cas de cuirs chauffés mettent en évidence une augmentation de la stabilité hydrothermique dans le glycérol.



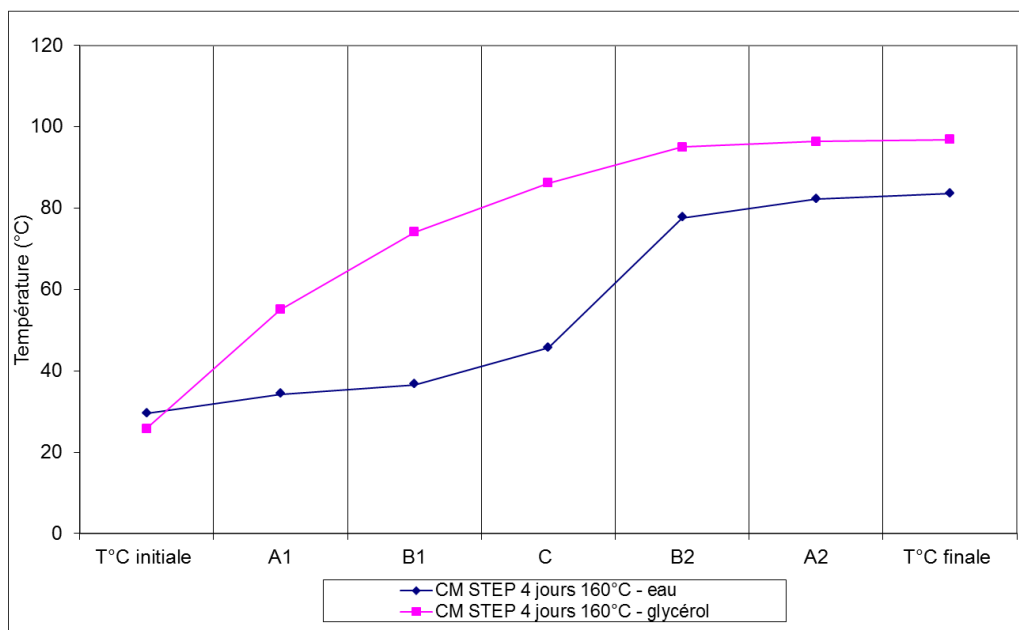


Figure 90 : Comparaison de la stabilité « hydrothermique » de fibres de cuirs chauffés CM STEP 4 jours 160°C par la technique de la MHT en excès d'eau ou de glycérol pur.

Dans l'eau, les phénomènes de contraction sont décelables dès 34°C et la contraction de l'ensemble des fibres (étape C) a lieu à 45°C. En présence de glycérol pur, les premières contractions de fibres isolées ne sont observables qu'à partir de 55°C et le phénomène de contraction de l'ensemble des fibres (étape C) a lieu à 86°C.

L'augmentation de la stabilité « hydrothermique » observée en présence de glycérol est attribuable à la diminution de mobilité des fibres protéiques. Les interactions glycérol-eau sont formées aux dépens des interactions eau-collagène, l'eau est liée au polyol et la stabilité de cette liaison est largement accrue (quelques  $\mu$ s au lieu de ps pour l'eau pure). Les protéines dont le collagène sont donc beaucoup moins hydratées en présence de fortes concentrations de glycérol qui mobilise l'eau. Les liaisons protéine-protéine sont plus nombreuses que les liaisons protéine-eau, les structures protéiques sont stabilisées. Ce phénomène est à l'origine des propriétés thermo- et cryo-protectrices des polyols en général et du glycérol, le plus fort dépresseur d' $a_w$  (Gekko et Timasheff 1981).

Ces observations permettent d'expliquer les phénomènes de rétraction observés lors des essais de restauration précédents réalisés à 37°C pour une activité optimale de l'enzyme. En effet, la technique de la table chauffante met en évidence une initiation des phénomènes de contraction dès 34°C lorsque l'échantillon est placé dans l'eau. Cette rétraction provoquée par le contact avec l'eau vient s'ajouter à celle due à l'exposition à la chaleur et déjà décrite.

Afin d'éviter/limiter les phénomènes de rétraction, il est donc nécessaire de diminuer la part d'eau dans notre traitement et/ou de diminuer la température. Afin de permettre une action de l'enzyme, il est préférable d'abaisser la température, même si cela peut entraîner une diminution de l'efficacité de l'enzyme, la présence d'eau étant indispensable à son activité.

Les futurs essais de restauration seront entrepris à température ambiante (variation de la température au cours de l'année de 16 à 26°C).

Les résultats obtenus dans le cas de l'application du traitement enzymatique à base de glycérol ne sont pas satisfaisants en raison de la coloration de l'échantillon de cuir brut ainsi que par le manque de souplesse au toucher des échantillons traités. Cependant les dernières expériences révèlent l'intérêt de diminuer très fortement la quantité d'eau libre dans le milieu réactionnel de l'enzyme. Une autre manière de diminuer la quantité globale d'eau tout en gardant un environnement aqueux pour l'enzyme consiste à utiliser des milieux micro-structurés.

Un nouveau support d'application a été testé : l'émulsion enzymatique composée d'une phase aqueuse dans laquelle l'enzyme est introduite et d'une phase hydrophobe qui pourrait permettre une meilleure application du traitement sur la surface des cuirs, elle-même hydrophobe. L'émulsion est le support le plus efficace pour mettre en œuvre une enzyme en milieu biphasique (Stoddart 2012).

#### IV. EMULSION ENZYMATIQUE

Le support qui semble le mieux adapté pour l'application d'une enzyme en surface du cuir en vue de sa restauration est l'émulsion. C'est un système formé par la dispersion de fines gouttelettes d'un liquide dans un autre avec lequel il n'est pas miscible. L'émulsion est un système hors équilibre qui évolue vers des floculats, un crémage, une sédimentation ou une séparation de phases. L'ajout de tensioactif ou surfactant au système permet de diminuer la tension interfaciale entre les deux liquides et d'obtenir la formation de micelles. Les émulsions peuvent être :

- Directes dans le cas d'une émulsion de type huile dans eau
- Inverses dans le cas d'une émulsion de type eau dans huile

Le support idéal doit contenir une phase aqueuse permettant l'activité de l'enzyme, il est préférable de n'utiliser que de l'eau (celle de la formulation) afin d'éviter tout phénomène de coloration et dans une conformation non dommageable pour le cuir chauffé. L'émulsion doit être active sur une surface hydrophobe et, afin de limiter les phénomènes de rétraction, les essais de restauration seront réalisés à température ambiante.

Ces conditions d'applications ne sont pas optimales pour une action enzymatique, elles permettent cependant d'éviter les dégradations supplémentaires.

Ce cahier des charges a été transmis à Monsieur BAUCE, directeur de la société TRIMADEL, spécialisée dans les produits d'entretien du cuir qui nous a fourni plusieurs émulsions dont une réalisée à façon susceptible de répondre aux exigences du projet.

Le traitement sélectionné est additionné de protéase avant application sur les cuirs. L'enzyme sélectionnée est l'Espérase®, qui par son conditionnement permet une meilleure homogénéité du traitement et une utilisation à des concentrations élevées, ici 150U/mL. Les résultats de l'application du traitement à une échelle macroscopique sont présentés en **Figure 91**.









	CM brut	CM 4 jours 160°C
Avant traitement		
Emulsion sans enzyme		
Emulsion enzymatique		

Figure 91 : Effet de l'application d'une émulsion enzymatique sur cuirs bruts ou chauffés après 24 heures de contact à température ambiante sur l'aspect des échantillons.

L'application des émulsions ne provoque ni coloration, ni rétraction des échantillons. Par ailleurs au toucher les cuirs traités avec l'émulsion enzymatique semblent plus souples. La présence de l'enzyme semble potentialiser les effets de l'émulsion.

Ces premiers essais de restauration, réalisés à température ambiante, se sont révélés encourageants aussi une caractérisation complète a été entreprise.

## B. Caractérisation des effets du traitement émulsion enzymatique

Afin de répondre à nos attentes, le traitement doit rendre de la souplesse aux cuirs exposés à la chaleur sans induire de modifications macroscopiques délétères. Différentes méthodes d'analyses ont été appliquées pour caractériser des effets du traitement à différentes échelles structurales. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'impact de l'application du traitement sur les propriétés visuelles et mécaniques.

La caractérisation a été effectuée sur l'ensemble des échantillons de cuir de tannage au mimosa exposés à la chaleur selon différentes conditions (CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C, CM 4 jours 160°C). La caractérisation a été faite 3 jours après application du traitement (choix arbitraire de la durée post caractérisation) réalisée à température ambiante.

### I. CARACTERISATION DES EFFETS DE L'EMULSION SUR L'ASPECT DES ECHANTILLONS

Les variations d'aspect des échantillons après application du traitement ont été évaluées par colorimétrie, observations à la loupe optique, angles de contact et capacités d'absorption d'eau.

#### I.1. VARIATIONS DE COULEUR

Les valeurs  $L^*a^*b^*$  ont été obtenues par colorimétrie, la différence de couleur  $\Delta E$  calculée. (**Tableau 11**).













	CM brut	CM 4 jours 100°C	CM 25 heures 160°C	CM 4 jours 160°C
				
$\Delta E$ CM brut /	0	8,3	27,4	31,6
Traitements appliqués: valeur de différence de couleur $\Delta E$ entre cuirs non traités et cuirs ayant reçu les deux types d'émulsion				
Emulsion sans enzyme				
	5,4	4,3	7,3	6,7
Emulsion enzymatique				
	7,5	5,4	8,5	8,0

Tableau 11 : Photographie et calcul de la différence de couleur  $\Delta E$  après application des différents traitements enzymatique et non enzymatique.

Les valeurs de  $\Delta E$  obtenues dans le cas de l'application de l'émulsion sans enzyme étant comprises entre 4,3 et 7,3, une différence de couleur de couleur est perceptible après application de l'émulsion mais elle est minime.

Dans le cas de l'émulsion enzymatique, les valeurs sont comprises entre 5,4 et 8,5. Elles sont légèrement plus élevées que celles observées sans enzyme mais restent proches de 5. L'ajout de l'enzyme au sein de l'émulsion entraîne une légère coloration des échantillons.

L'application des émulsions (avec ou sans enzyme) ne permet pas un retour vers la couleur d'origine (avant exposition à la chaleur).

Les effets des émulsions (avec ou sans enzyme) sur la morphologie et les propriétés de surface ont été caractérisés par microscopie et mesure d'angles de contact.

## I.2. MORPHOLOGIE DE SURFACE

Les effets du traitement ont été observés à une échelle microscopique par microscopie optique et MEB. Les résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 92**).

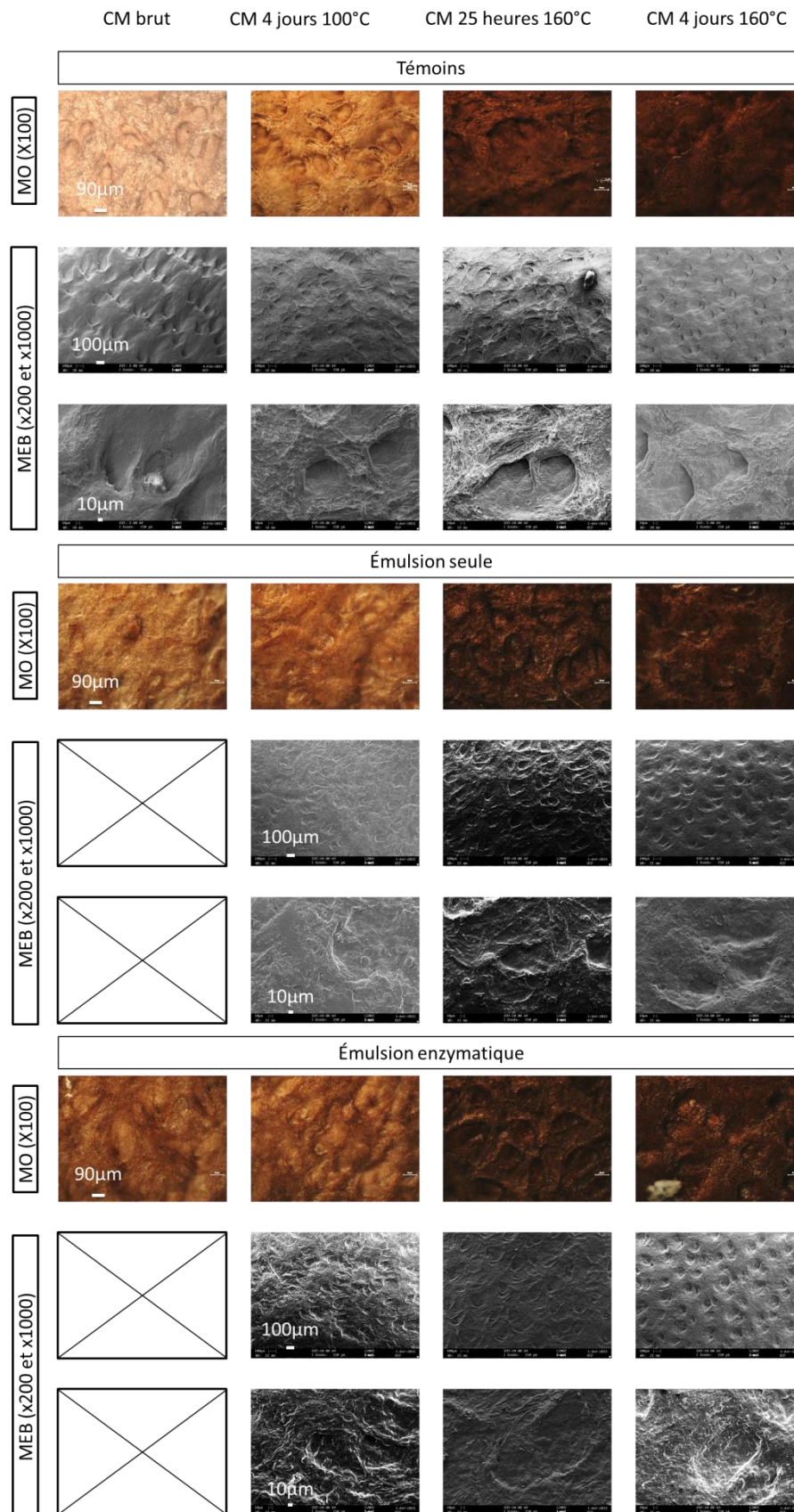


Figure 92 : Observations en microscopie optique en champ sombre ((MO, lumière rasante) et microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface fleur des cuirs brut (CM brut) et chauffés (CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C et CM 4 jours 160°C). Le traitement émulsion additionné ou non d'enzyme a été appliqué en surface, les cuirs non traités font office de témoins.

L'application de l'émulsion avec ou sans enzyme induit une modification de la morphologie de surface. L'émulsion seule semble lisser la surface des différents échantillons (bruts et chauffés) par comblement des pores. Cet effet peut être dû au dépôt d'une couche de matière en surface. La présence de l'enzyme modifie davantage la surface des échantillons qui semble abrasée. Ces résultats mettent en évidence un léger effet de l'enzyme au niveau de la face fleur. Bien que l'application du traitement enzymatique améliore la morphologie de certains échantillons (exemple du cuir chauffé 4 jours à 160°C), l'application de l'émulsion avec ou sans enzyme ne permet pas de redonner au cuir chauffé une morphologie similaire à celle d'un cuir brut.

Afin de voir si les modifications de surface entraînent des variations de propriétés, des mesures d'angles de contact ont été réalisées sur échantillons traités.

### I.3 PROPRIETES DE SURFACE ET CAPACITES D'ABSORPTION D'EAU

Les propriétés de surface des échantillons après application des émulsions ont été étudiées par mesures d'angle de contact et mouillabilité. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (**Figure 93**).

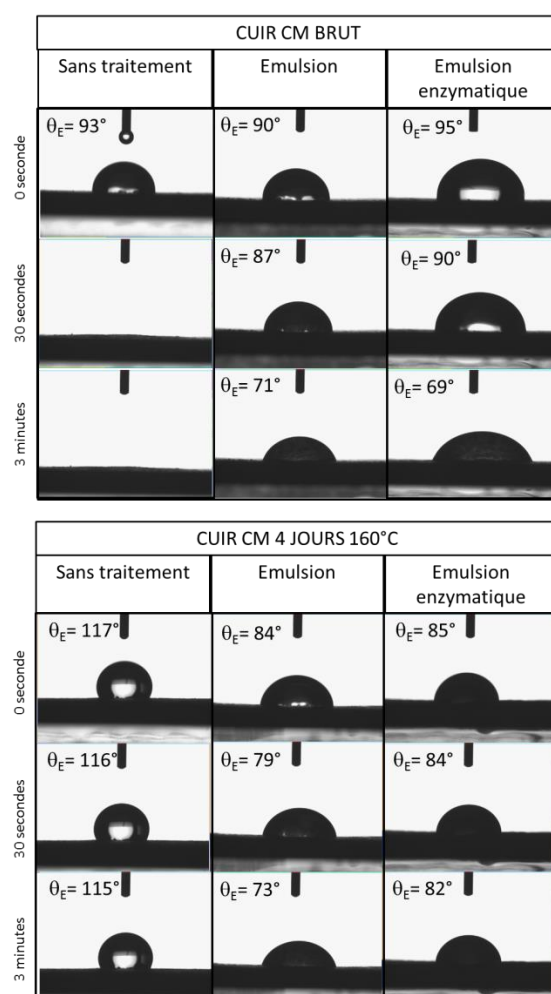


Figure 93 : Angles de contact observés dans le cas d'échantillons bruts et chauffés 4 jours à 160°C après application du traitement émulsion enzymatique ou émulsion seule.

L'analyse des propriétés de surface des cuirs bruts révèle un caractère hydrophobe mais mouillable. L'application de l'émulsion sans enzyme modifie les propriétés de surface des cuirs bruts. Les valeurs d'angles de contact sont de l'ordre de 90° signe que la surface est hydrophobe. Par ailleurs, la mouillabilité augmente au cours du temps, l'angle de contact diminuant (de 90° à 71° à 3 minutes). L'application du traitement ralentit fortement la cinétique de pénétration de la goutte, sans doute par la présence du corps gras qui forme une barrière hydrophobe. Des résultats similaires sont obtenus en présence d'enzyme.

L'exposition à la chaleur induit une augmentation de l'hydrophobie de surface du cuir qui devient non mouillable. L'application de l'émulsion rend les cuirs légèrement hydrophiles (valeurs  $\theta_E < 90^\circ$ ). La mouillabilité augmente, les valeurs d'angle de contact diminuent avec le temps (de 84 à 73° à 3 minutes), même si la goutte d'eau n'a pas pénétré après 3 minutes. Des observations similaires sont faites en présence d'enzyme. Les propriétés obtenues sont donc attribuables en majeure partie, voire en totalité à l'émulsion et peuvent être corrélées avec ses propriétés amphiphiles.

Afin de voir si l'application des émulsions entraîne une modification au niveau de l'ensemble du matériau, des mesures de capacités d'absorption d'eau ont été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 94**.

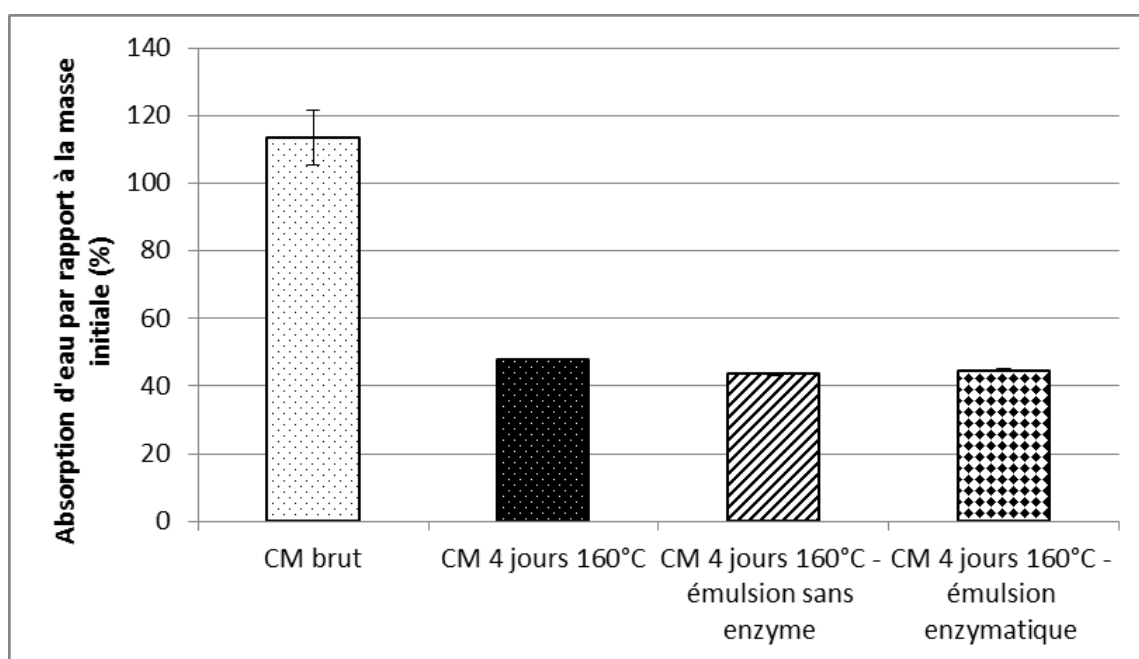


Figure 94 : Pourcentage d'absorption d'eau par rapport à la masse initiale observé dans le cas d'échantillons bruts (CM brut), exposés à la chaleur (CM 4 jours 160°C) puis traités par application de l'émulsion vierge ou enzymatique (CM 4 jours 160°C – émulsion sans enzyme ou – émulsion enzymatique).

L'application des émulsions avec ou sans enzyme ne permet pas de redonner aux cuirs chauffés leurs capacités d'absorption d'eau. Par conséquent il peut être supposé que l'effet du traitement observé par MEB et mesures d'angles de contact est limité à la surface de l'échantillon. On peut s'interroger sur l'importance de la durée de contact entre l'émulsion et le cuir. Dans ces expériences, le contact est de 3 jours. Cependant, la diffusion au sein d'un solide est un phénomène lent et les caractérisations précédentes ont montré que les cuirs, surtout après chauffage contiennent très peu d'eau et sont hydrophobes ce qui signifie de très mauvaises conditions de transfert et d'expression

d'activité pour l'enzyme. Il serait intéressant de mesurer les effets à long terme de la préparation enzymatique.

Un objectif majeur des traitements est de redonner de la souplesse aux cuirs, aussi, afin de déterminer si l'application des émulsions avec et sans enzyme induit des modifications au niveau des propriétés mécaniques, des mesures de module de conservation, corrélées avec la souplesse de l'échantillon ont été réalisées par DMA et rhéologie.

## II. PROPRIETES MECANIQUES

Un des enjeux du traitement de restauration est de redonner de la souplesse aux cuirs exposés à la chaleur, afin de pouvoir à nouveau les manipuler voire les solliciter mécaniquement.

### II.1. EFFET DU TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUR LA FLEXIBILITE DU CUIR

Comme présenté dans la partie caractérisation, la rhéologie et la DMA constituent deux méthodes d'analyses non destructives qui permettent d'obtenir des informations sur la souplesse des échantillons. La procédure mise en place afin de pallier les variations notables entre échantillons, consiste à caractériser un même échantillon brut, puis après chauffage et enfin après application des émulsions. Les valeurs obtenues sont propres à chaque échantillon. Les résultats ont été normalisés afin de permettre une comparaison des valeurs. Dans le cas de l'ensemble des échantillons, les valeurs de  $G'$  sont supérieures à celles de  $G''$ . A titre indicatif les valeurs de  $G'$  et  $G''$  sont données dans le cas des cuirs témoins dans le **Tableau 12**.

	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
CM brut	$2,3 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^4$
CM 4 jours 100°C	$2,1 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^4$
CM 25 heures 160°C	$3,3 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^4$
CM 4 jours 160°C	$4,0 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^4$

*Tableau 12 : valeurs de modules de stockage  $G'$  et de perte  $G''$  obtenues par rhéologie dans le cas de cuirs bruts et chauffés (CM brut, CM 4 jours 100°C, CM 25 heures 160°C, CM 4 jours 160°C).*

Les échantillons ont été caractérisés 3 jours après application du traitement. Les valeurs obtenues sont présentées en **Figure 95**.

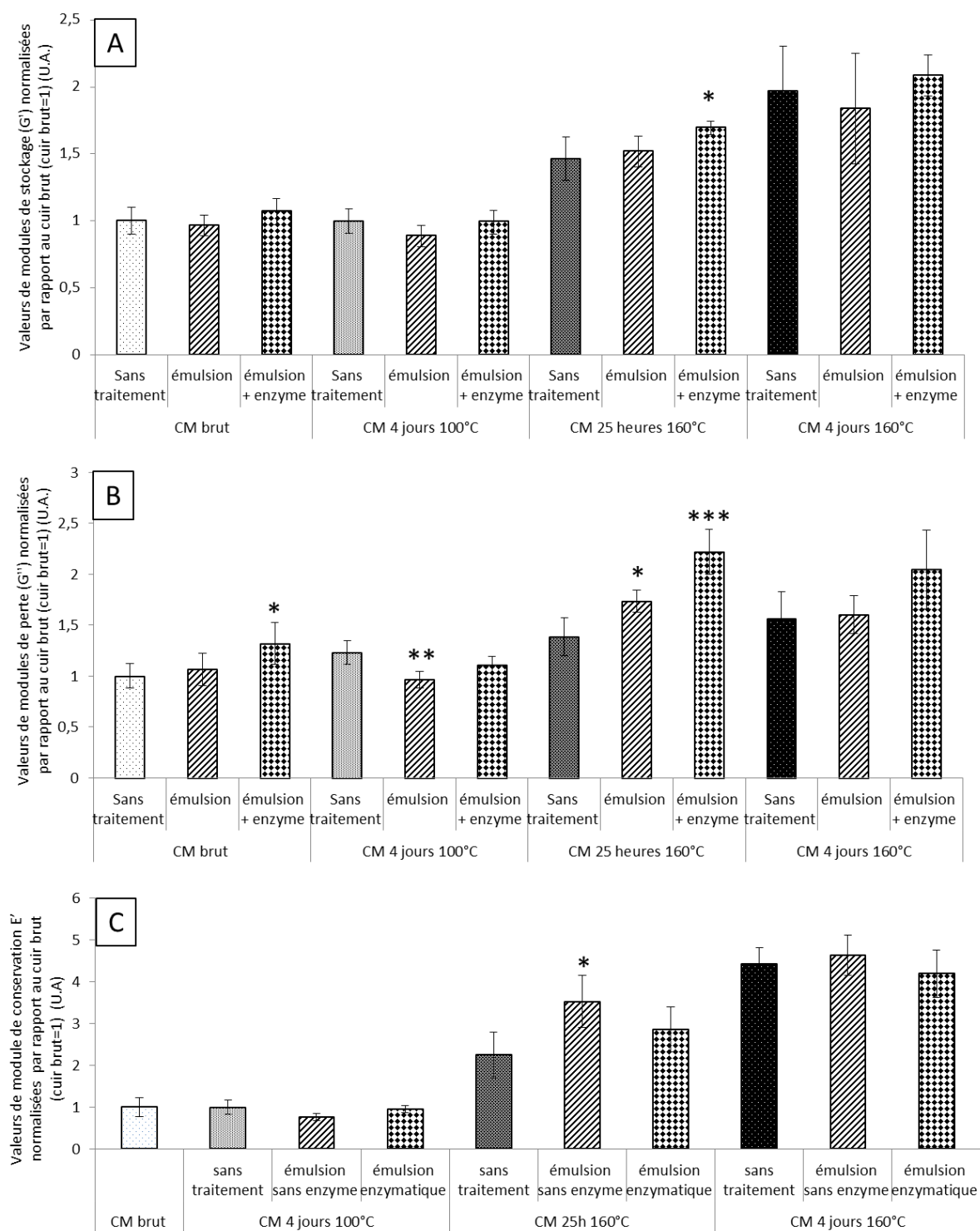


Figure 95 : Effets des traitements (émulsion avec ou sans enzyme) sur les propriétés mécaniques de cuirs mimosa bruts et exposés à la chaleur pendant 4 jours à 100°C, 25 heures à 160°C et 4 jours à 160°C. Les valeurs des cuirs chauffés sont normées par rapport au cuir brut et celles des cuirs traités par rapport aux cuirs chauffés (cuir brut=1). [A-B] mesures de rhéologie. [A] Effets de l'application de l'émulsion avec ou sans enzyme sur les valeurs de module de stockage ( $G'$ ). [B] Effets de l'application de l'émulsion avec ou sans enzyme sur les valeurs de module de perte ( $G''$ ). [C] : Mesures des modules de conservation  $E'$  par DMA. Les tests statistiques sont calculés par rapport à l'échantillon normé correspondant avec  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0.001$  : \*\*\*.



L'application de l'émulsion sur le cuir brut (rhéologie-**Figure 95** [A] et [B]) n'entraîne pas de modifications des propriétés mécaniques de l'échantillon. L'ajout d'enzyme entraîne une augmentation significative des valeurs de  $G''$  qui traduit une augmentation de la viscosité intrinsèque du matériau. Cette variation peut être corrélée à une diminution de la mobilité et/ou une augmentation de la concentration en molécules internes au matériau et non intégrées au réseau solide.

Dans le cas du cuir chauffé pendant 4 jours à 100°C, l'application de l'émulsion seule semble redonner de la souplesse aux cuirs, la mobilité des molécules est augmentée de manière significative (\*\*) (**Figure 95**[A]). L'ajout d'enzyme ne modifie pas les propriétés mécaniques du cuir chauffé 4 jours à 100°C. Des résultats similaires sont obtenus par analyse DMA.

L'application du traitement émulsion sur les échantillons de cuir exposés pendant 25 heures à 160°C met en évidence une augmentation significative des valeurs de  $G''$  dans le cas de l'émulsion seule (\*) et dans le cas de l'émulsion enzymatique (\*\*\*) (**Figure 95** [B]). Dans ce dernier cas, une augmentation significative des valeurs de  $G'$  (\*) est également constatée (**Figure 95** [A]). Ces variations de modules sont corrélées à une diminution de la mobilité des molécules après application des deux traitements (émulsion avec et sans enzyme). Des observations similaires sont faites par DMA. Elles mettent en évidence une rigidification des échantillons après application du traitement sans enzyme. La présence de l'enzyme n'améliore cependant pas la souplesse des échantillons.

Après application des émulsions (avec ou sans enzyme) sur les cuirs exposés pendant 4 jours à 160°C, aucune variation significative de modules n'est observée à l'aide des deux techniques d'analyse.

L'ensemble des résultats obtenus ne met pas en évidence d'effets significatifs de l'émulsion sur les propriétés mécaniques du cuir, donc pas de restauration de la souplesse. L'ajout d'enzyme ne donne pas de meilleurs résultats.

Il est important de noter que les effets observés sont fortement dépendant des échantillons et au vu des écarts types observés en DMA, il semblerait que la variabilité augmente avec les conditions d'exposition à la chaleur, ainsi elle est plus marquée dans le cas des échantillons chauffés 4 jours à 160°C. La **Figure 96** indique les variations de gains de souplesse observés dans le cas de 10 échantillons de cuirs chauffés 4 jours à 160°C sur lesquels l'émulsion enzymatique a été appliquée.

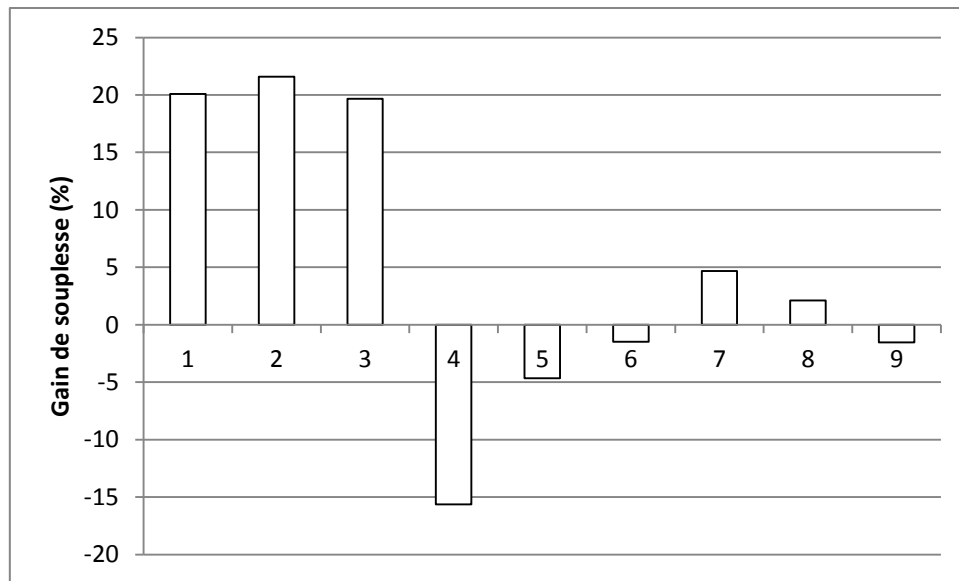


Figure 96 : Valeurs de gain de souplesse observées dans le cas de divers échantillons de cuirs chauffés traité par l'émulsion enzymatique.

La variabilité des effets de l'application de l'émulsion enzymatique est très forte et ce même dans le cas d'échantillons voisins sur la peau. Comme le montre la **Figure 96**, certains échantillons traités semblent montrer un gain de souplesse et d'autres une rigidification après application de l'émulsion enzymatique.

Cette variabilité qualitative importante nécessite d'étudier de près la méthode d'analyse ainsi que la vitesse de réaction avec l'émulsion enzymatique pour déterminer s'il existe ou non un effet lié au traitement. Pour cela une mesure en continu a été réalisée. Elle consiste à suivre les variations de module de conservation  $E'$  après l'application du traitement et pendant les 3 jours suivants.

Pour mener à bien cette expérience, une éprouvette de cuir chauffé a été caractérisée avant application de l'émulsion enzymatique. L'échantillon de cuir chauffé a été sélectionné pour ses propriétés de rigidité très importante ce qui permettra de mettre plus facilement en évidence un éventuel effet du traitement. La valeur de module de conservation relevée est de 229MPa. Cette valeur sera considérée comme valeur de référence du cuir avant traitement. L'émulsion enzymatique a ensuite été appliquée en surface de l'échantillon qui est placé immédiatement entre les mors de l'appareil. La cinétique a été enregistrée pendant 3 jours à 25°C. Les résultats sont présentés ci-dessous en **Figure 97**.

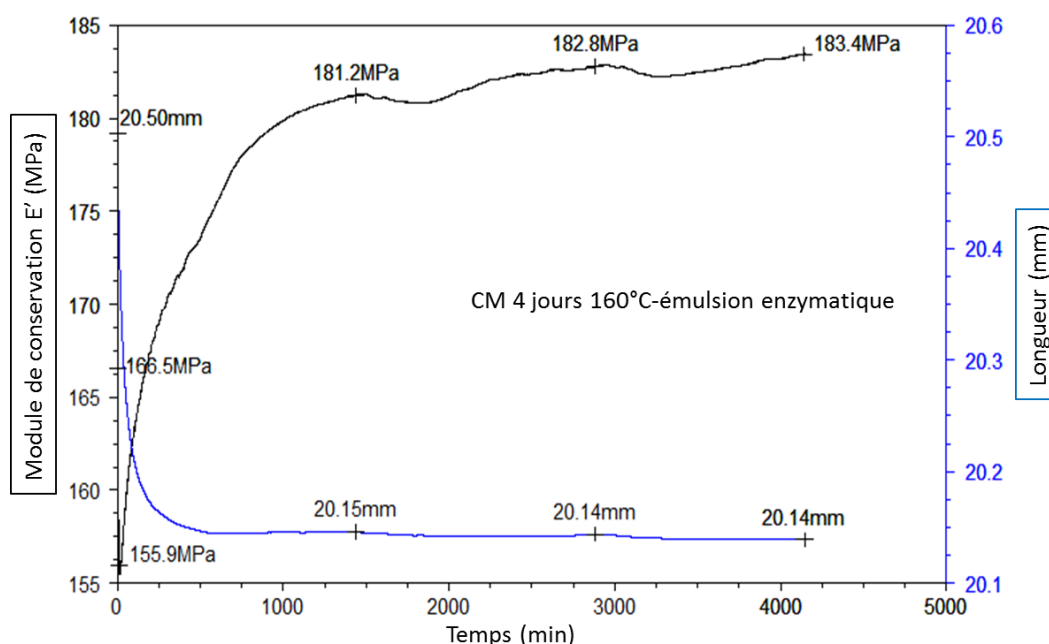


Figure 97 : Suivi de l'effet du traitement émulsion enzymatique appliquée sur un cuir chauffé. Les variations de module de conservation  $E'$  et de taille sont suivies par DMA depuis le moment de l'application et jusqu'à 3 jours après traitement.

L'action du traitement « émulsion enzymatique » s'opère en trois phases distinctes (signal noir). Lors de la première phase, qui correspond aux premières minutes post application du traitement, les valeurs de module de conservation diminuent fortement. Elles passent de 229MPa (valeur de référence de l'échantillon mesurée avant traitement) à 166 MPa (valeur observée au temps zéro de l'acquisition, soit environ 10 minutes après application du traitement) puis atteignent 156MPa trente minutes après le début de l'acquisition. L'effet du traitement sur la souplesse du cuir semble être quasi-instantané. Il pourrait être dû en partie à l'apport d'humidité par l'émulsion enzymatique. Dans un deuxième temps, les valeurs de module de conservation augmentent fortement au cours des premières vingt-quatre heures, passant de 156MPa à 181MPa. Après les premières 24 heures, un plateau est atteint et les valeurs n'augmentent que de 2,2MPa en 48 heures. Cette seconde phase pourrait être attribuée à un séchage de l'échantillon.

Afin de discerner les variations imputables à l'application enzymatique et celles imputables à la méthode, une mesure continue a également été réalisée sur un échantillon de cuir chauffé mais non traité. Les variations de module de conservation  $E'$  obtenues au cours du temps sont présentées en **Figure 98**.

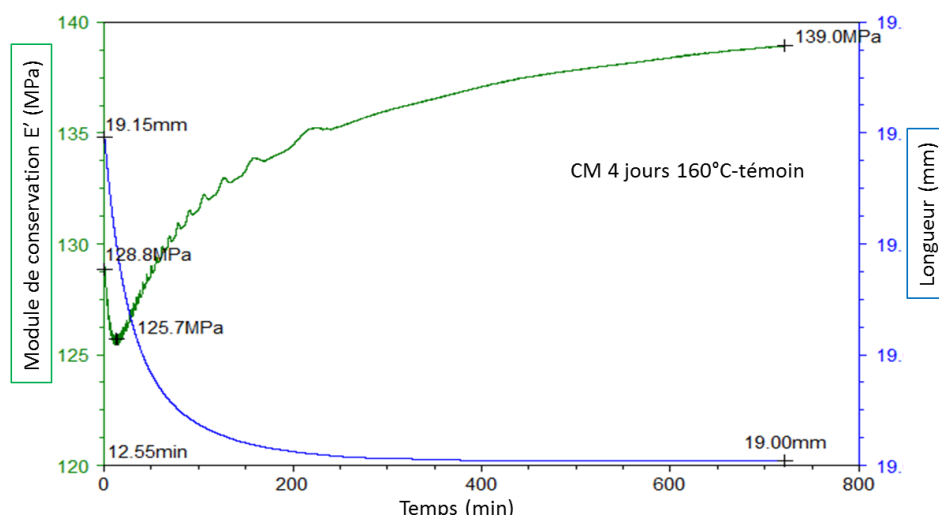


Figure 98 : Variations des valeurs de module de conservation  $E'$  et de taille observées par DMA dans le cas d'un cuir témoin, non traité, au cours de la sollicitation de l'échantillon pendant 3 jours.

Dans le cas du cuir chauffé témoin (**Figure 98**), un profil d'évolution du  $E'$  similaire est observé. Après une diminution rapide du module de conservation, les valeurs de  $E'$  augmentent progressivement indiquant une rigidification.

La mesure des valeurs de module de conservation avant la mesure était de 126MPa. Elle est de 129MPa au début de l'acquisition en continu ce qui indique que les mesures sont reproductibles et que la baisse importante de valeurs de module observée dans le cas du cuir traité n'est pas due à un défaut de reproductibilité. Au bout de douze heures d'acquisition, les valeurs atteignent 139MPa.

La comparaison des profils observés entre échantillons de cuirs chauffé traité (application de l'émulsion enzymatique) ou non traité met en évidence une diminution importante et immédiate des valeurs de module de conservation après application de l'émulsion enzymatique, comme indiqué dans le **Tableau 13**. Une telle observation ne peut être faite dans le cas du cuir témoin.

	Avant (première mesure ponctuelle) –	Première valeur – mesure en cinétique	Valeur la plus basse	Valeur au bout de 12heures d'acquisition	Gain de souplesse
CM 4 jours 160°C – témoin	126MPa	129 MPa	126MPa	139MPa	-10%
CM 4 jours 160°C –émulsion enzymatique	229MPa	166MPa	156 MPa	178MPa	22%

Tableau 13 : Evolution des valeurs de module de conservation au cours de la mesure en cinétique des effets de l'émulsion enzymatique et comparaison avec les valeurs du cuir témoin (non traité).

Il peut donc être conclu que l'application de l'émulsion enzymatique sur cet échantillon très rigide entraîne une nette diminution des valeurs de module de conservation  $E'$  pouvant être corrélées à

une augmentation de la souplesse. L'effet du traitement est immédiat et se poursuit lors des premières trente minutes (diminution de 73 MPa, contre 3 MPa pour le cuir témoin).

L'augmentation des valeurs de module visible dans les deux cas au cours de la mesure peut être imputée à un assèchement des échantillons, l'expérience étant réalisée sous flux d'air continu. Cette évolution positive de  $E'$  commence plus rapidement en absence d'enzyme. A la fin de l'acquisition les valeurs de modules observées dans le cas du cuir témoin sont légèrement supérieures à celles observées avant la mesure en continu (139MPa contre 126 MPa). Dans le cas du cuir traité, les valeurs restent très inférieures à celles observées avant la mesure en continu (183MPa contre 229MPa)

La mesure de la taille de l'échantillon au cours de l'acquisition pendant 3 jours à 160°C (signal bleu) met en évidence une rétraction de l'ordre de 1,76% dans le cas de l'application de l'émulsion enzymatique. Cette rétraction est négligeable et due à la mesure elle-même comme en témoigne la rétraction de l'ordre de 1,70% observée dans le cas d'un échantillon témoin, chauffé, non traité sollicité selon les mêmes paramètres pendant 12 heures. Ce phénomène est dû sans doute au séchage, son amplitude est plus faible que celle des modules  $E'$ .

L'observation du profil obtenu permet également de voir que le signal, très variable lors des premières heures suivant l'application du traitement, se stabilise. Au bout de trois jours, le signal semble stable. Ceci indique que les variations importantes de modules de conservations observées entre échantillons distincts ne sont pas dues à une variation du signal du fait de l'action du traitement. Cela permet de valider nos résultats précédemment obtenus par DMA.

Toutefois, la mesure en continu n'a été réalisée que sur un échantillon. Dans ce cas, les résultats obtenus mettent en évidence un effet positif du traitement caractérisé par une diminution des valeurs de module de conservation de l'ordre de 46 MPa soit un gain de souplesse de l'ordre de 20% si l'on considère la valeur finale, et de 32% si l'on tient compte de la valeur la plus faible. Cette expérience permet de valider le choix, arbitraire, de la caractérisation trois jours après application du traitement car après cette durée, même sous flux d'air, les valeurs de module évoluent peu.

L'absence de témoin émulsion sans enzyme ne permet cependant pas de conclure quant à un effet de l'enzyme sur le matériau pouvant entraîner un gain de souplesse. Le gain de souplesse important pourrait être dû à l'émulsion en elle-même.

Afin de répondre à nos interrogations et savoir si l'enzyme peut avoir un quelconque effet sur les échantillons de cuir, des matrices modèles ont été utilisées.

## C. Analyse des capacités protéolytiques de l'enzyme sur des matrices modèles.

Les matrices modèles utilisées lors de notre étude ont été obtenues à partir de gels de gélatine immergés dans une solution contenant un agent réticulant. Différents types de matrices modèles ont été étudiés.

Formées d'un gel de gélatine, qui correspond à du collagène dénaturé, ces matrices ont pour objectif de « mimer » un cuir. Cette étude permettra de voir si une action protéolytique de l'enzyme est possible et de savoir si la dégradation est totale ou partielle. Elle permettra également de connaître la vitesse de réaction de l'enzyme choisie afin d'optimiser la durée du traitement, c'est-à-dire la durée à partir de laquelle une ré-application / un arrêt du traitement est préconisé.

Pour faciliter la détermination de ces paramètres, l'étude de la dégradation des matrices modèle est réalisée par immersion dans une solution d'enzyme à même concentration que celle utilisée dans le cas des émulsions (150U/mL).

Ces matrices ont été utilisées pour contrôler l'action protéolytique de l'Espérase<sup>®</sup> sur une matrice de gélatine réticulée.

Les molécules de gélatine sont capables de former des gels thermosensibles dits physiques. Lorsque la solution de gélatine est préparée (à une température proche de 40°C), les macromolécules sont dans une conformation de pelote aléatoire (random coil). Lors du refroidissement de cette solution, si la température est inférieure à 30°C et la concentration en gélatine (m/V) supérieure à 0,5%, les macromolécules changent progressivement de conformation et forment localement des triples hélices, voisines de celles du collagène d'origine, au niveau des zones riches en proline et hydroxyproline. Le gel obtenu, très riche en eau, est dit physique (Papon, Leblond, et Meijer 2007).

Lorsque la température augmente, le réseau reste sous forme de gel jusqu'à ce que la température de transition hélice / pelote statistique soit atteinte; alors, une transition de phase gel/sol a lieu et le gel redevient liquide.




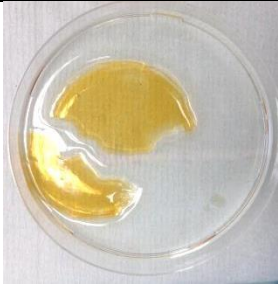
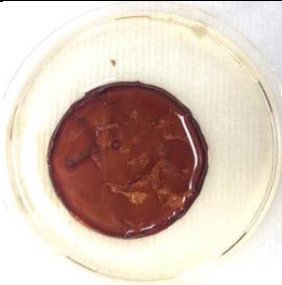

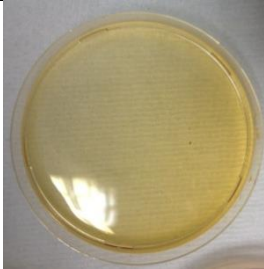
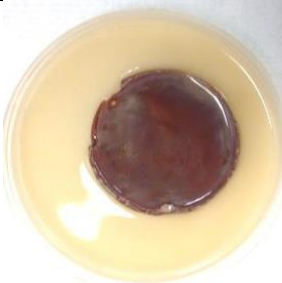

Dans les expériences suivantes, un gel physique, riche en triple hélices est obtenu (5% m/V, formation du gel à 4°C pendant 2 heures). Ce gel est ensuite placé dans différentes solutions possédant un pouvoir réticulant : une solution de glutaraldéhyde et/ou de tannin.

La réticulation avec du glutaraldéhyde implique la réaction entre ses groupements aldéhydiques et les groupements amine (Speer et al. 1980) notamment des lysines. On considère que le glutaraldéhyde a pour effet de « geler » la conformation des protéines, la gélatine dans le gel réticulé par le glutaraldéhyde est toujours structurée en triple hélices localement, similaires à celles du collagène.

Dans le cas de l'utilisation d'une solution de tannin, il est attendu la formation de nombreuses interactions de faible énergie accompagnées par la formation de liaisons covalentes par l'intermédiaire des quinones des tannins condensés. La concentration de tannins utilisée est identique à celle préconisée dans le protocole de tannage du cuir CM, soit 10% (annexe protocole de tannage).

L'immersion des gels de gélatine dans ces différentes solutions provoque la formation de liaisons covalentes. Les gels sont alors des gels chimiques, inchangés par la température.

Les différentes matrices obtenues ont ensuite été immergées pendant 3 jours à température ambiante dans une solution enzymatique à base d'Espérase®. Les résultats sont présentés en **Figure 99**.

	Gélatine + glutaraldéhyde	Gélatine + tannins	Gélatine + glutaraldéhyde puis tannins
Temps 0 – avant contact avec les solutions			
Témoin solution sans enzyme			
Solution enzymatique			

*Figure 99 : Effets de l'incubation entre différentes matrices modèles réticulées (glutaraldéhyde, et/ou tannins) et une solution d'Espérase® (150U/mL) pendant 3 jours à température ambiante*

Après 3 jours d'incubation dans la solution protéolytique, le gel de gélatine réticulé par le glutaraldéhyde est totalement liquéfié. Ce résultat montre que l'Espérase® est capable d'hydrolyser une matrice de gélatine pontée par liaison covalente. Elle peut donc reconnaître la séquence de la gélatine y compris structurée en triple hélices.

En présence de tannins condensés, la membrane de gélatine, réticulée ou non par le glutaraldéhyde, n'est plus hydrolysée par la protéase.

La réticulation par les tannins entraîne une forte coloration des gels de gélatine réticulés ou non par le glutaraldéhyde. Elle empêche aussi leur hydrolyse par l'enzyme même après 7 jours de réaction. On peut cependant observer une modification de l'aspect du gel et un relargage de composés colorés qui n'existe pas avec le témoin sans enzyme, ni lorsque les tannins sont appliqués sur un gel préalablement réticulé au glutaraldéhyde.

Une série d'expériences complémentaires est entreprise pour comprendre les raisons de l'absence ou de la diminution d'action de l'enzyme en présence de tannins.

La première hypothèse émise est que la présence des tannins inactiverait l'enzyme. Pour vérifier cette hypothèse, la protéase a été pré-incubée pendant 2 heures avec une solution de tannins concentrée avant contact avec un gel de gélatine.

Dès contact entre l'enzyme et la solution de tannins concentrée, un précipité apparaît. Ce mélange Espérase® /tannin est ensuite déposé sur un gel de gélatine. Il est possible que les molécules de tannins puissent réticuler une partie des enzymes et ainsi ralentir leur activité. Cependant la protéase reste active et hydrolyse totalement le gel de gélatine en moins de 48 heures. Il peut donc être conclu que même après contact avec les tannins, l'enzyme reconnaît toujours les chaînes de gélatine organisées en triple hélices. L'absence d'hydrolyse en 7 jours n'est pas due à une inactivation de l'enzyme par les tannins. Par ailleurs, la formation instantanée du précipité traduit la forte réactivité de ces tannins sur les protéines.

Les tests réalisés jusqu'à présent étaient entrepris sur des gels de gélatine. La gélatine correspond à du collagène dénaturé et le processus de gélification utilisé recrée l'organisation des chaînes en triple hélices, le modèle d'étude est donc proche de la conformation des molécules de collagène. Cependant au sein des tissus comme la peau des interactions existent entre le collagène et les autres macromolécules qui peuvent changer sa sensibilité aux protéases. L'enzyme choisie pourrait être incapable de reconnaître les protéines, notamment le collagène, dans leurs conformations et associations supramoléculaires au sein de la peau.

Afin de savoir si l'enzyme est capable d'hydrolyser les protéines de la peau, elle a été incubée avec un échantillon de parchemin. Tout comme le cuir, le parchemin est obtenu à partir d'une peau. Les premières étapes de transformation d'une peau en parchemin et en cuir sont communes, cependant la fabrication d'un parchemin ne nécessite pas d'utilisation de tannins. La peau est simplement mise à sécher sous tension. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (**Figure 100**).

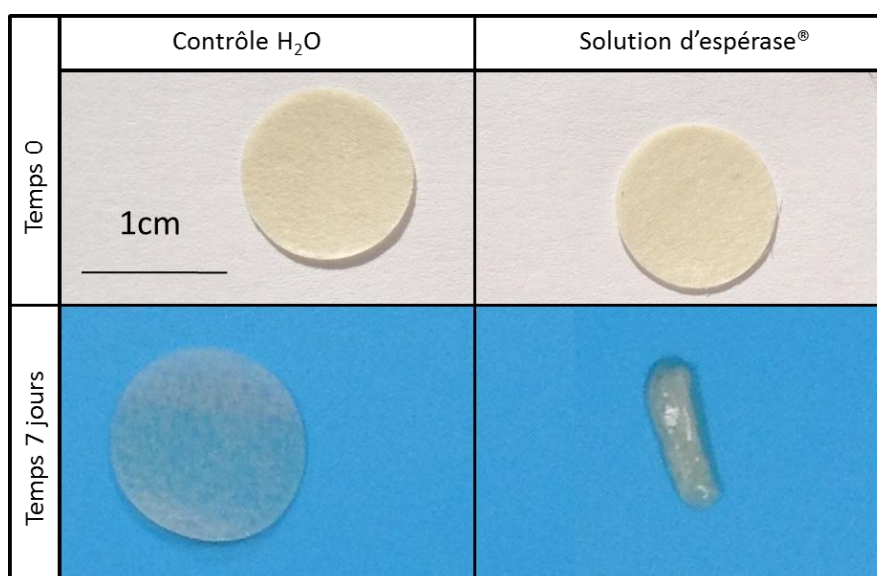


Figure 100 : Effets de l'incubation d'un parchemin dans une solution d'Espérase® (150U/mL) pendant 7 jours à température ambiante.



L'immersion d'une pastille de parchemin dans de l'eau provoque son gonflement. Au bout de 7 jours d'immersion, le diamètre de l'échantillon a augmenté de 15% ; il reste cohésif et manipulable. En présence d'enzyme, le parchemin est dégradé. Il devient gélatineux et perd sa consistance.

Ce résultat révèle que l'Esperase peut avoir une action protéolytique (visible à l'œil nu) sur un matériau fabriqué à partir de peau. L'enzyme est donc capable d'hydrolyser les réseaux de protéines des matériaux à base de peau.

Ces deux expériences montrent que l'enzyme est active en présence de tannins et capable d'hydrolyser les réseaux de protéines contenus dans la peau non tannée. Par contre elle s'avère inefficace lorsque les protéines sont au préalable réticulées par les tannins. Il peut être conclu au vu des résultats que l'enzyme est incapable d'agir sur les complexes formés entre les protéines et les tannins. Des tests complémentaires basés sur l'utilisation d'enzymes, présentes dans le tube digestif des ruminants et capables de rompre les complexes protéines /tannins (pepsine et trypsine) n'ont pas permis de mettre en évidence d'action de l'enzyme sur les matrices modèles réticulées aux tannins dans les conditions de notre étude.

L'ensemble des caractérisations effectuées sur les cuirs et les matrices modèles permettent de conclure que l'enzyme est incapable d'agir sur les complexes protéines-tannins. La formation de complexes protéiques avec les tannins pendant le processus de fabrication du cuir ajoutée à celle attribuable à la chaleur laisse supposer que l'enzyme a très peu de chance de pouvoir agir efficacement sur les échantillons de cuir chauffés.

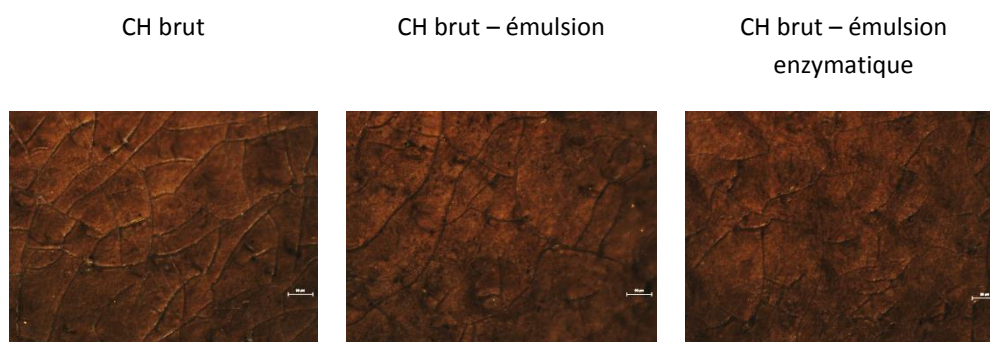
Afin de déterminer si l'émulsion enzymatique peut avoir un effet sur un cuir non chauffé mais altéré et rigidifié, des essais d'application des émulsions avec et sans enzyme ont été entrepris sur un cuir historique de veau, prélevé sur une reliure datée du XIXe siècle.

## D. Caractérisation des effets du traitement émulsion enzymatique sur un cuir historique de veau

Les essais de restauration entrepris sur cuirs historiques ont été réalisés selon la même procédure que celle utilisée dans le cas des échantillons exposés à la chaleur. Les effets du traitement seront caractérisés par quelques méthodes clés : l'observation en microscopie optique et la DMA.

Chaque cuir ancien a son histoire propre dont résulte son état et sa fragilité. Ainsi les conclusions de la présente étude seront uniquement indicatives et ne permettront pas d'extrapoler à un usage possible du traitement sur l'ensemble des cuirs anciens.

Dans un premier temps, une rapide caractérisation de l'aspect des échantillons a été entreprise par microscopie optique (X 100) en lumière rasante (**Figure 101**).

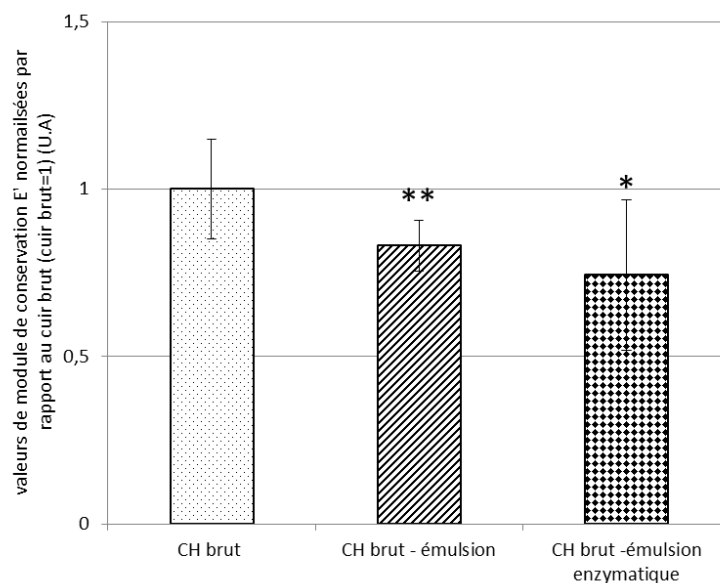


*Figure 101 : Surface d'un échantillon de cuir de veau historique (XIXe siècle) vue en microscopie optique en champs sombre (x100), avant et après application de l'émulsion avec ou sans enzyme (Espérase®).*

Les observations montrent un effet des émulsions sur la couleur des échantillons en provoquant un brunissement, cependant la surface semble lissée. Ce phénomène est plus marqué en présence d'enzyme.

Les valeurs de module de conservation observées dans le cas du cuir historique sont de l'ordre de 250MPa. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles observées dans le cas des échantillons de cuirs mimosa CM précédemment caractérisés. Les valeurs des cuirs bruts étaient de l'ordre de 20 MPa ; après exposition à la chaleur pendant 4 jours à 160°C, condition la plus drastique, les valeurs ne dépassaient pas 230MPa. Dans le cas des cuirs STEP, fabriqués dans les années 90, les valeurs étaient du même ordre de grandeur après exposition 4 jours à 160°C. Ceci pourrait être attribuable à un phénomène de rigidification du cuir au cours de son vieillissement naturel. Ces observations sont en accord avec les études de l'équipe d'Odlyha et al (Odlyha et al 2000). Un gain de souplesse serait donc appréciable.

Les valeurs de modules de conservation  $E'$  avant et après application des traitements ont été normalisées par rapport au cuir brut. Les résultats sont présentés en **Figure 102**.



*Figure 102 : Effets des traitements (émulsion avec ou sans enzyme) sur les propriétés mécaniques de cuirs historiques (cuir de veau prélevé sur un ouvrage daté du XIXe siècle). Les valeurs sont normées (cuir brut=1). Les tests statistiques sont calculés par rapport à l'échantillon normé correspondant avec  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0.001$  : \*\*\*.*

L'application de l'émulsion avec ou sans enzyme induit une diminution significative des valeurs de module de conservation  $E'$ , corrélées avec une diminution de la rigidité de l'échantillon. L'effet de l'enzyme est peu marqué.

L'utilisation d'émulsion pour redonner de la souplesse à un cuir ancien n'est pas nouvelle. Cependant, ces techniques de lubrification ont causé beaucoup de dommages sur les cuirs anciens et sont actuellement décriées. Les effets à court terme semblent positifs mais les conséquences de ces traitements à long terme sont parfois désastreuses (croissance de microorganismes, augmentation de la rigidité).

## E. Effet du traitement à long terme sur les cuirs chauffés

Le résultat obtenu avec le traitement par l'émulsion simple ou enzymatique du cuir historique, très rigide nous amène à reconsidérer l'ensemble de nos résultats.

Nous avons observé des modifications d'aspect et d'hydrophobie de surface pour les cuirs chauffés traités par les émulsions enzymatiques. En revanche, nous n'avons pas pu observer de restitution des capacités d'hydratation, ni d'amélioration reproductible des propriétés mécaniques. Le traitement mis au point semble donc avoir un effet limité sur la surface du cuir et ne pas produire de modification substantielle dans la masse de celui-ci.

De surcroît, les effets observés semblent dus à l'émulsion elle-même sans contribution majeure de l'enzyme. Une étude sur matrices modèles a confirmé la faible activité de l'enzyme sur les complexes protéines-tannins. Dans le cas des cuirs chauffés, de nouveaux complexes protéiques diminuent encore la capacité protéolytique de l'enzyme. Cependant, l'activité de l'enzyme ne semble pas nulle.

Pour voir les effets des émulsions avec et sans enzyme sur des durée supérieures, une deuxième caractérisation a été entreprise pour certains échantillons. Deux des échantillons ayant montré des effets positifs et additionnels de l'émulsion et de l'enzyme après 3 jours ont été analysés de nouveau 10 semaines après application du traitement. Des cuirs mimosa chauffés 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C) ont été choisis. La **Figure 103** présente les résultats obtenus au bout de 3 jours et de 10 semaines après application des émulsions avec et sans enzyme.

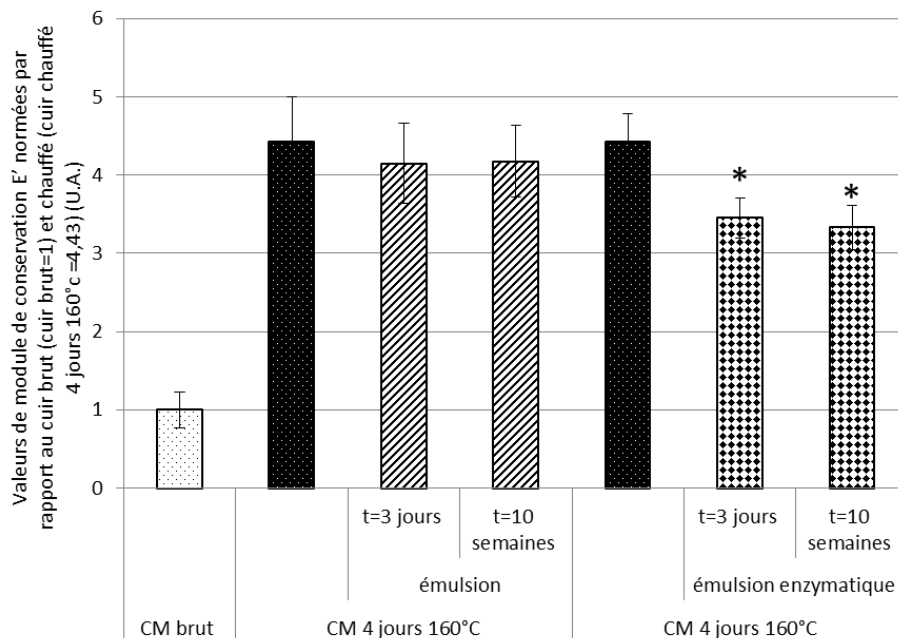


Figure 103 : Effets des traitements (émulsion avec ou sans enzyme) sur les propriétés mécaniques de cuirs de tannage au mimosa chauffés 4 jours à 160°C (CM 4 jours 160°C). Les valeurs sont normées (cuir brut=1 et cuir chauffé 4 jours 160°C=4,43). Les tests statistiques sont calculés par rapport à l'échantillon normé correspondant avec  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\*.

Les résultats obtenus dans le cas de l'application de l'émulsion seule permettaient d'obtenir un gain de souplesse de 5,6% après 3 jours d'application du traitement. Aucune différence n'est observée après 10 semaines. Ce résultat montre que sur la période considérée, l'émulsion n'a pas entraîné les effets néfastes de rigidification du cuir observés avec d'autres formulations (discussions avec les restaurateurs ARSAG, 2014) après une amélioration sur le court terme. L'émulsion élaborée pour ce projet semble prometteuse.

En présence d'enzyme, le gain de souplesse à trois jours était de 20%, montrant un effet significativement positif de l'enzyme. Après 10 semaines, une légère amélioration est observée (gain de souplesse de 24%). Ceci pourrait laisser supposer que l'action de l'enzyme est très lente et qu'il est nécessaire de caractériser son effet à plus long terme pour pouvoir conclure à son action véritable. Ce résultat est encourageant ; cependant, il faut le relativiser en raison du faible nombre d'échantillons (2). Seul environ  $\frac{1}{4}$  des applications (sur une vingtaine d'échantillons CM chauffés 4 jours 160°C) de notre émulsion enzymatique et  $\frac{1}{2}$  de l'application de l'émulsion seule donnait de bons résultats.

Afin de confirmer cette donnée, il serait impératif de caractériser les effets à plus long terme (plusieurs mois, voire années). Même si l'enzyme s'avérait réellement efficace, son effet et sa diffusion semblent suffisamment lents et devrait être suffisamment réduit pour ne pas devenir délétère sur le très long terme, le nombre de liaisons hydrolysables dans l'ensemble du cuir étant fortement réduit pas la formation des complexes et des agrégats ; mais il conviendra de le vérifier.

## Conclusion générale de la deuxième partie : stratégie de restauration par voie enzymatique

L'idée directrice de cette seconde partie des travaux reposait sur l'utilisation de protéases pour rompre les agrégats protéiques apparus suite à l'exposition à la chaleur. Une des difficultés de l'utilisation d'enzyme est la nécessité pour le traitement de contenir une phase aqueuse en quantité suffisante pour une action de l'enzyme sans que celle-ci ne rentre en contact direct avec le cuir. Le respect de ces conditions permet d'éviter une rétraction supplémentaire des échantillons causée par le contact avec l'eau. Par ailleurs, il est nécessaire que le traitement ne provoque aucune dégradation additionnelle. Les effets des traitements ont été étudiés au niveau de l'aspect visuel et des propriétés mécaniques.

Après de nombreux essais, un support adapté a été trouvé. Il est constitué d'une émulsion à laquelle une protéase est ajoutée. Le choix de l'enzyme s'est porté sur l'Espérase®, sérine protéase aspécifique conditionnée sous forme liquide en présence de surfactant, utilisable à forte concentration. L'application des émulsions et la conservation des échantillons ont été réalisées à température ambiante.

Les différentes caractérisations entreprises au bout de 3 à 7 jours après traitement sur cuirs et matrices modèles ont révélé que l'enzyme ne peut agir que très faiblement sur de tels matériaux en raison de la présence des tannins.

L'exposition des cuirs à la chaleur entraîne une sur-agrégation des protéines, l'activité de l'enzyme dans ces conditions ne peut donc être que très limitée.

L'application des émulsions sur un cuir historique, rigide mais non chauffé révèle un gain de souplesse sans doute attribuable majoritairement à l'émulsion. Le contrôle de la stabilité des effets du traitement plus de 2 mois après l'application révèle dans le cas de l'émulsion enzymatique une très légère amélioration en comparaison du temps 3 jours post application ce qui n'est pas le cas pour l'émulsion seule. Ce résultat pourrait laisser supposer que l'enzyme peut avoir une action mais que sa cinétique d'action est extrêmement lente du fait de la complexité du matériau. Seules de nouvelles caractérisations des effets des traitements enzymatiques sur cuir ou matrice modèle à des temps beaucoup plus longs (mois, années) pourraient permettre de répondre à cette question.

# Conclusion générale

Obtenu à partir d'une peau et plus particulièrement du derme, le cuir est un matériel biologique complexe constitué majoritairement de collagène de type I. La transformation d'une peau en cuir requiert de nombreuses étapes dont le bon déroulement assure l'obtention d'un matériau de qualité. Parmi les étapes clefs du processus de fabrication, le tannage a une importance primordiale. A l'heure actuelle, le mécanisme de fixation des tannins aux molécules de collagène, dépendant du type de tannin utilisé (hydrolysable ou condensés) n'est pas parfaitement connu. Les molécules de collagène vont être stabilisées par les tannins via de nombreuses interactions de faible énergie (tannins hydrolysables et condensés) voire des liaisons covalentes (tannins condensés) intra et intermoléculaire. A la suite du tannage, un matériau très complexe, résistant à la putréfaction et à la chaleur et présentant de bonnes propriétés mécaniques, est obtenu. Ses propriétés lui permettent de mieux résister aux effets du temps et de constituer la base d'un grand nombre d'objets du patrimoine tels que les reliures, des vêtements ou encore des instruments de musique.

Interpellés par les problèmes de conservation de ces matériaux biologiques exposés à la chaleur dans le cas d'incendies, nous avons entrepris une étude dont la première étape était de déterminer les effets de la chaleur sur les cuirs de tannage végétal dans l'espoir de développer un support biologique pour la restauration des cuirs chauffés.

Pour mener à bien cette étude, un modèle d'exposition à une chaleur sèche a été développé et différents types de cuirs ont été exposés à la chaleur dans des conditions paramétrées et définies expérimentalement. Afin de pallier aux problèmes de diffusion de chaleur rencontrés à haute température, il a été nécessaire d'abaisser la température et d'allonger le temps d'exposition à la chaleur dans le but d'obtenir un matériau macroscopiquement homogène.

L'utilisation de cuirs récents, ou âgés d'une vingtaine d'année, non altérés et dont le protocole de fabrication est parfaitement connu a permis une comparaison des échantillons avant et après exposition à la chaleur. L'étude a été réalisée sur 4 cuirs de tannage au sumac, 2 cuirs de tannage au mimosa et 2 cuirs commerciaux de type de tannage inconnu dont l'un était coloré ; ces différents cuirs nous ont permis de montrer si les résultats observés étaient ou non dépendants du type de tannage. L'essentiel des résultats présentés a été obtenu sur deux peaux tannées à notre demande selon un procédé connu.

L'ensemble des techniques utilisées dans le cadre de cette étude a permis de caractériser et quantifier les effets de l'exposition (temps et température) d'un cuir à une chaleur sèche à différentes échelles de structure.

Certaines techniques d'analyses, telles que la TGA et l'ATD, ont mis en évidence des résultats qualitativement différents entre échantillons de cuir de tannage au sumac et au mimosa et pourraient constituer des méthodes permettant l'identification du type de tannin, hydrolysable ou condensé.

Suite à l'exposition à la chaleur, des variations importantes de l'aspect général des cuirs ont été observées, caractérisées par un fort brunissement sans doute dû à la dénaturation des tannins, accompagné d'une perte de masse (pouvant aller jusqu' 18% de la masse initiale dans les cas les plus extrêmes) attribuable en partie à la déshydratation de l'échantillon et à la dénaturation/dégradation de ses constituants. Une rétraction est également constatée. Elle peut atteindre 18% en longueur et largeur. L'exposition à la chaleur provoque également une augmentation de l'hydrophobie de surface



(d'environ 90 à 130° pour les angles de contact) et diminue de moitié les capacités d'absorption d'eau des échantillons ce qui traduit un remaniement des constituants protéiques de surface et internes au cuir entraînant l'exposition de leurs groupements hydrophobes.

Le phénomène de thermo-oxydation observé dans le cas de l'exposition à une chaleur sèche est à l'origine de l'acidification des cuirs et participe également à la fragilisation des molécules de collagène, facteur pouvant être impliqué dans la modification des propriétés mécaniques des cuirs.

Ces processus sont accompagnés d'une fonte des structures cristallines, d'une agrégation des protéines, ainsi que d'une forte rigidification des échantillons pouvant être augmentée d'un facteur supérieur à 4 dans les cas les plus extrêmes.

Bien que des variations très importantes de propriétés, notamment mécaniques puissent être observées entre échantillons voisins, les variations engendrées par la chaleur sont qualitativement identiques dans le cas des différents types de cuir et sont beaucoup plus prononcées que celles induites par les variations entre cuirs et au sein d'une même peau.

L'ensemble de ces phénomènes est observé dans le cas des cuirs de tannage au mimosa et au sumac et est dépendant de la température et du temps d'exposition à la chaleur, les effets étant additionnels dans la majeure partie des cas, voire synergiques. Cependant, l'effet de la température est beaucoup plus important que celui du temps.

L'exposition à la chaleur semble induire deux phénomènes d'altération distincts. D'une part elle provoquerait une désorganisation au niveau de la structure des molécules de collagène et d'autre part elle entraînerait la formation de nouvelles liaisons stabilisatrices. Les conséquences de l'exposition à la chaleur sont visibles depuis l'échelle moléculaire jusqu'au matériau dans son ensemble. Ces résultats confirment un certain nombre de données tout en apportant de nouvelles informations quant à l'effet de la chaleur sur un même échantillon à différentes échelles de structure.

Il paraît très difficile, voire impossible de redonner aux constituants du cuir leur structure et propriétés physico-chimiques originelles quelque soit le traitement envisagé. En revanche il paraît davantage réalisable d'essayer de contrer les conséquences de la formation des nouvelles liaisons covalentes par l'utilisation d'enzyme de type protéase afin de rompre les agrégats protéiques néoformés.

Le deuxième objectif de cette étude était d'envisager une restauration par voie biologique (enzymatique), sans doute plus respectueuse des cuirs exposés à la chaleur, l'objectif majeur étant de redonner de la souplesse aux cuirs pour les rendre à nouveau manipulables.

Le choix d'un support adapté à un traitement enzymatique des cuirs s'est avéré complexe. Un des principaux challenges était de développer un support constituant un milieu adapté pour l'enzyme, c'est-à-dire contenant de l'eau, dans un état non dommageable pour le cuir. Différentes solutions, divers types de gels, plusieurs milieux contenant des dépresseurs d'activité de l'eau ont été utilisés comme supports de l'enzyme, sans succès car ils entraînaient une forte modification de l'aspect des cuirs, caractérisée par une rétraction des cuirs accompagnée dans certains cas d'une coloration.

Seul un support de type émulsion semble convenir, dans le cas de notre émulsion aucune coloration ni rétraction des échantillons n'est à déplorer. Par ailleurs, le cuir paraît plus souple au toucher.

L'ajout d'une enzyme de type protéase ne semble pas donner de meilleurs résultats lors de la caractérisation des effets du traitement trois jours après application. Concernant les propriétés mécaniques, les effets observés sont fortement dépendant des échantillons ce qui ne permet pas de conclure quant à une réelle efficacité du traitement et de l'enzyme.

L'étude de l'activité protéolytique de l'enzyme sur des matrices modèles protéiques réticulées au glutaraldéhyde ou par ajout de tannins, formées à partir de gélatine, a mis en évidence une action de l'enzyme uniquement en absence de tannins. Le contrôle de l'activité dans le cas du parchemin a mis en évidence une action de l'enzyme possible sur un matériau aussi complexe que la peau à condition que les constituants ne soient pas réticulés par des tannins.

Les effets observés trois jours après application du traitement semblent essentiellement dus à l'émulsion en elle-même et non pas à l'enzyme.

Cependant, des tests effectués 10 semaines après application du traitement ont révélé un effet de l'émulsion sur le gain de souplesse qui perdure dans le temps, uniquement en présence d'enzyme. Ce résultats pourrait laisser penser que l'enzyme agit, cependant compte tenu de la très grande complexité du matériau et de son très faible taux d'hydratation, sa cinétique ne peut être qu'extrêmement lente. Cet élément est rassurant car une des craintes liées à l'utilisation d'enzyme était que la réaction d'hydrolyse soit trop poussée.

A l'heure actuelle, le traitement développé ne répond pas à l'ensemble des attentes formulées par les Archives Nationales, les effets de la chaleur étant fortement délétères pour les propriétés mécaniques du cuir. Une caractérisation des effets du traitement sur des temps plus longs (mois voire années) et sur un plus grand nombre d'échantillons serait nécessaire pour conclure quant à la réelle capacité de l'émulsion enzymatique à restaurer une partie de la souplesse des cuirs endommagés par une exposition à la chaleur.

Comme abordé antérieurement, l'exposition à la chaleur induit la formation d'agrégats protéique, et renforce le nombre de complexes déjà présents par interactions entre protéines et tannins.

Après vérification des effets des traitements à plus long terme, l'utilisation de l'émulsion pourrait être envisagée dans le cas des cuirs historiques, dont le processus d'agrégation est supposé être moins marqué que dans le cas des cuirs chauffés.

Par ailleurs, l'application sur parchemins, pour lesquels une action de l'enzyme est avérée, pourrait constituer une technique de restauration lorsqu'ils sont altérés, devenus rigides et cassants.

Il serait également intéressant d'essayer de comprendre à quoi sont dues les variations très importantes d'efficacité du traitement.

## Références bibliographiques

- A**bdel-Maksoud, G. 2011. « Analytical techniques used for the evaluation of a 19th century quranic manuscript conditions ». *Measurement* 44 (9): 1606-17.
- Aftab, M N., Hameed, A., et Ikram-ul-Haq, C. 2006. « Biodegradation of Leather Waste by Enzymatic Treatment ». *The Chinese Journal of Process Engineering* 6 (3): 8-11.
- Arntfield, S.D., et Murray E.D.. 1981. « The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation ». *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 14 (4): 289-94.
- B**adea, E., Della Gatta, G. et Budrugaec, P.. 2011. « Characterisation and Evaluation of the Environmental Impact on Historical Parchments by Differential Scanning Calorimetry ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 104 (2): 495-506.
- Badea, E., Miu, L., Budrugaec, P., Giurginca, M., Mašić, A., Badea, N., et Della Gatta, G. 2008. « Study of Deterioration of Historical Parchments by Various Thermal Analysis Techniques Complemented by SEM, FTIR, UV-Vis-NIR and Unilateral NMR Investigations ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 91 (1): 17-27.
- Barbe, C., Aubry, T., Bouvet, S., Nguyen, T-P., Deconnink, I., Juchauld, F. et Thao, S.. 2006. « BnF-Professionnels : Conservation - Sélection d'un cuir de veau de tannage végétal destiné à la restauration de livres anciens : premiers résultats ».
- Bernath, A., Miu, L. et Guttman, M. 2008. « Identifications, Microanalysis, Evaluations and Diagnosis of an Ethnographical Leather Object », 9th International Conference on NDT of Art, Jerusalem Israel.
- Bhushan, B., Jung, Y. C. et Koch, K.. 2009. « Micro-, Nano- and Hierarchical Structures for Superhydrophobicity, Self-Cleaning and Low Adhesion ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 367 (1894): 1631-72.
- Biémont, E. 2008. *Spectroscopie moléculaire: Structures moléculaires et analyse spectrale*. De Boeck Supérieur.
- Blond, G., et Le Meste M. 1988. « Propriétés d'hydratation des macromolécules. Relation avec leurs propriétés fonctionnelles. » In *Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires*. Les cahiers de l'ENS. BANA 6.
- Boulais, N., et Misery, L. 2008. « The epidermis : a sensory tissue ». *Eur J Dermatol* 18 (2): 119-27.
- Bowes, J. H., et Cater, C. W. 1965. « Crosslinking of Collagen ». *Journal of Applied Chemistry* 15 (7): 296-304.
- Bowes, J. H., et Raistrick, A. S. 1967. « The action of heat and moisture on leather. Part VI. Degradation of the collagen ». *Amer. Leather Chemists Assoc., J* 62 (4): 240-57.
- Bowes, J. H., et Taylor, J. E. 1970. « Effect of Dry Heat on Collagen and Leather ». *American Leather Chemists Association. Journal*, 96-117.
- Buchanan, S. A. 1990. « Chapitre six - Sauvetage des documents endommagés par le feu ». In *lutte contre les sinistres dans les bibliothèques et les archives - prévention, prévision, sauvetage : une étude RAMP accompagnée de principes directeurs*.
- Budrugaec, P., Cucos, A. et Miu, L.. 2011. « The Use of Thermal Analysis Methods for Authentication and Conservation State Determination of Historical And/or Cultural Objects Manufactured from Leather ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 104 (2): 439-50.
- Budrugaec, P. et Miu, L. 2008. « The suitability of DSC method for damage assessment and certification of historical leathers and parchments ». *Journal of Cultural Heritage* 9 (2): 146-53.

- C**arșote, C., Budrugaec, P., Decheva, R., Haralampiev, N. S., Miu, L. et Badea, E. 2014. « Characterization of a Byzantine Manuscript by Infrared Spectroscopy and Thermal Analysis ». *Revue Roumaine de Chimie* 2014 (596-7): 429-36.
- Cassel, J. M. 1958. « Degradation of collagen by heat ». *Journal of the American Leather Chemists' Association* 53: 507-24.
- Cassie, A. B. D., et Baxter, S. 1944. « Wettability of porous surfaces ». *Transactions of the Faraday Society* 40: 546-51.
- Chahine, C. 2013. *Cuir et parchemin ou la métamorphose de la peau*. Edition CNRS.
- Chen, M., Przyborowski, M. et Berthiaume, F. 2009. « Stem cells for skin tissue engineering and wound healing ». *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Biomedical Engineering* 37 (4-5).
- Choman, B. R. 1961. « Determination of the Response of Skin to Chemical Agents by an In Vitro Procedure ». *Journal of Investigative Dermatology* 37 (4): 263-71.
- Claverie, I., Panet, M. et Barbeau, S. 2008. *Biochimie*. Edition Wolters Kluwer France.
- Covington, A. D. 1997. « Modern Tanning Chemistry ». *Chemical Society Reviews* 26 (2): 111.
- Covington, A. D. et Covington, T. 2009. *Tanning Chemistry: The Science of Leather*. Edition Royal Society of Chemistry.
- Cucos, A., Budrugaec, P., Miu, L., Mitrea, S. et Sbarcea, G. 2011. « Dynamic mechanical analysis (DMA) of new and historical parchments and leathers: Correlations with DSC and XRD ». *Thermochimica Acta* 516 (1-2): 19-28.
- Cucos, A. et Budrugaec, P. 2010. « The Suitability of the DMA Method for the Characterization of Recent and Historical Parchments and Leathers ». *International Journal of Conservation Science* 1 (1): 13-18.
- Cucos, A., Budrugaec, P. et Miu, L. 2014. « DMA and DSC studies of accelerated aged parchment and vegetable-tanned leather samples ». *Thermochimica Acta* 583 (mai): 86-93.
- D**avis, P. J. et Williams, S. C.. 1998. « Protein Modification by Thermal Processing ». *Allergy* 53 (octobre): 102-5.
- Della Gatta, G., Badea, E., Ceccarelli, R., Usacheva, T., Maši, A. et Coluccia, S.. 2005. « Assessment of Damage in Old Parchments by DSC and SEM ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 82 (3): 637-49.
- Dupont, J. C. et Mathieu, J. 1981. *Les Métiers du cuir*. Presses Université Laval.
- E**yre, D. 2002. « Collagen of articular cartilage ». *Arthritis research* 4 (1): 30-35.
- F**ligiel, S. E. G., Varani, J., Datta, S. C., Kang, S., Fisher, G.J. et Voorhees, J. J. 2003. « Collagen Degradation in Aged/photodamaged Skin in Vivo and after Exposure to Matrix Metalloproteinase-1 in Vitro ». *The Journal of Investigative Dermatology* 120 (5): 842-48.
- Florian, M.-L. E. 2006. « The mechanisms of deterioration in leather ». In *Conservation of leather and related materials*, 36-57.
- Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J. et Mueller-Harvey, I. 2010. « Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Natural Bioactive Compounds and Nutrigenomics*, 51 (2): 490-95.
- Frazier, R. A., Papadopoulou, A., Mueller-Harvey, I., Kisson, D. et Green, R. J. 2003. « Probing Protein-Tannin Interactions by Isothermal Titration Microcalorimetry ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (18): 5189-95.

- G**abel, G. U. 2004. « La bibliothèque Anna-Amalia de Weimar endommagée par le feu ». Text. janvier 1. <http://bbf.enssib.fr/consulter/bbf-2004-06-0120-009>.
- Gal, J.-Y., et Carbonnell F. 1992. « Influence du pH et de l'Oxygène sur la Condensation des Polyphénols Naturels sur les Protéines ». *Bulletin de liaison - Groupe polyphénols* 16 (2): 358-61.
- Gekko, K., et Timasheff, S. N. 1981. « Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures ». *Biochemistry* 20 (16): 4667-76.
- Giraudier, S. et Larreta-Garde, V. 2007. « Antagonistic Enzymes May Generate Alternate Phase Transitions Leading to Ephemeral Gels ». *Biophysical Journal* 93 (2): 629-36.
- Gonnet, J-F. 1998. « Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1.A colorimetric definition using the CIELAB scale ». *food chemistry*, sect. vol.63, n°3.
- H**alaszczyńska, E. 2002. « Le Tan et le Temps ». *Techniques & Culture. Revue semestrielle d'anthropologie des techniques*, n° 38 (mars).
- Hertmanni, P., Picque, E., Thomas, D. et Larreta-Garde, V. 1991. « Modulation of protease specificity by a change in the enzyme microenvironment Selectivity modification on a model substrate, purified soluble proteins and gluten ». *FEBS Letters* 279 (1): 123-31.
- Hubmacher, D., Sabatier, L., Annis, D. S., Mosher, D. F. et Reinhardt, D. P. 2011. « Homocysteine modifies structural and functional properties of fibronectin and interferes with the fibronectin-fibrillin-1 interaction ». *Biochemistry* 50 (23): 5322-32.
- J**ackson, M. et Mantsch, H. H. 1991. « Protein secondary structure from FT-IR spectroscopy: correlation with dihedral angles from three-dimensional Ramachandran plots ». *Canadian Journal of Chemistry* 69 (11): 1639-42.
- Jullien, I., et Durande-Ayme, R. 1998. *Le Tannage végétal*. Édité par chaussure Centre technique Cuir. 1 vol. Lyon, France: Centre technique du cuir, chaussure, maroquinerie.
- K**anagy, J. R. 1940. « Effect of Oxygen and Moisture on the Stability of Leather at Elevated Temperatures ». *Journal of Research of the National Bureau of Standards* 25 (août): 149-59.
- Kanth, S. V., Venba, R., Madhan, B., Chandrababu, N.K. et Sadulla, S. 2008. « Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing ». *Dyes and Pigments* 76 (2): 338-47.
- Kato, A. et Takagi, T. 1988. « Formation of intermolecular .beta.-sheet structure during heat denaturation of ovalbumin ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36 (6):
- Kennedy, Craig J., et Tim J. Wess. 2003a. « The Structure of Collagen within Parchment – A Review ». *Restaurator* 24 (2).
- Kierszenbaum, A. L. 2006. *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
- Kite, M. et Thomson, R. 2006. *Conservation of Leather and Related Materials*. Routledge.
- Komai, Y. et Ushiki, T. 1991. « The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera ». *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 (8): 2244-58.
- L**arsen, R. 1992. « Summary, Discussion and Conclusion ». In *STEP Leather Project - Evaluation of the Correlation between Natural and Artificial Ageing of Vegetable Tanned Leather and Determination of Parameters for Standardization of an Artificial Ageing Method*, 165-80.

- Larsen, R. 1999. « Artificial ageing of vegetable tanned leather ». *Advanced Study Course*.
- Larsen, R. 2000. « Experiments and observations in the study of environmental impact on historical vegetable tanned leathers ». *Thermochimica Acta* 365 (1–2): 85–99.
- Larsen, R., Vest, M. et Calnan, C. 1994. « Materials ». In *STEP Leather Project - Evaluation of the Correlation between Natural and Artificial Ageing of Vegetable Tanned Leather and Determination of Parameters for Standardization of an Artificial Ageing Method*.
- Larsen, R., Vest, M. et Nielsen, K. 1993. « Determination of Hydrothermal Stability (Shrinkage Temperature) of Historical Leather by the Micro Hot Table Technique ». *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 77: 151–56.
- Le Meste, M. et Colas, B.. 1990. « Interactions entre l'eau et les constituants alimentaires : incidences sur les propriétés structurales et texturales ». In *L'eau dans les procédés de transformation et de conservation des aliments*. Les cahiers de l'ENS. BANA 7.
- Li, H., Chen, H. L., Luo, R., Liu, B. L. et Gao, L. Z. 2003. « The Interaction between Collagen and an Aluminum Tanning Agent ». *Macromolecular Bioscience* 3 (7): 344–46.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A. et Darnell, J. 2005. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Supérieur.

- M**achiels, D., et Istasse, L. 2002. « La réaction de Maillard: importance et applications en chimie des aliments ». *Ann. Méd. Vét* 146: 347–52.
- Maeser, M.. 1960. « The Effect of Hide Location and Cutting Direction on the Tensile Properties of Upper Leathers ». *The Journal of the American Leather Chemists Association* 55 (9): 501–30.
- Mann, M. I. 1978. *Methodes artisanales de tannage*. Food & Agriculture Org.
- Marcolli, C. et Peter, T. 2005. « Water activity in polyol/water systems: new UNIFAC parameterization ». *Atmos. Chem. Phys.* 5 (6): 1545–55.
- Maxwell, C. A., Wess, T. J. et Kennedy, C. J. 2006. « X-ray Diffraction Study into the Effects of Liming on the Structure of Collagen ». *Biomacromolecules* 7 (8): 2321–26.
- Miles, C. A., Avery, N. C., Rodin, V. V. et Bailey, A. J. 2005. « The Increase in Denaturation Temperature Following Cross-linking of Collagen is Caused by Dehydration of the Fibres ». *Journal of Molecular Biology* 346 (2): 551–56.
- Mokrzycki W. S et Tatol M. 2011. « Color difference Delta E - A survey ». *Machine Graphics and Vision* 20 (4): 383–411.
- Moussard, C. 2006. *Biochimie structurale et métabolique*. De Boeck Supérieur.
- Mueller-Harvey, I. 2001. « Analysis of hydrolysable tannins ». *Animal Feed Science and Technology* 91 (1–2): 3–20.

- N**agaraj, R. H., Shipanova, I. N. et Faust, F. M. 1996. « Protein Cross-Linking by the Maillard Reaction Isolation, Characterization, and In Vivo Detection of a Lysine-Lysine Cross-Link Derived From Methylglyoxal ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (32): 19338–45.

- O**dyha, M., Foster, G. M., Cohen, N. S. et Larsen, R.. 2000. « Characterisation of Leather Samples by Non-Invasive Dielectric and Thermomechanical Techniques ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 59 (1-2): 587–600.
- Ongoka, PR, Matini, L., Moutou, JM et Ngabe, D. Y. 2007. « Caractérisation des Indicateurs Colorés Naturels par Abondance des Quinones dans les Extraits de Quelques Végétaux ».

- P**andeeti, E. V. P., Pitchika, G.K., Jotshi, J., Nilegaonkar, V., Kanekar, P. P. et Siddavattam, D. 2011. « Enzymatic Depilation of Animal Hide: Identification of Elastase (LasB) from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 as a Depilating Protease ». *PLoS ONE* 6 (2): e16742.
- Papon, P., Leblond, J. et Meijer, P. H. E. 2007. *The Physics of Phase Transitions: Concepts and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Pierce, M.C., Sheridan, R. L., Hyle Park, B., Cense, B. et de Boer, J. F. 2004. « Collagen Denaturation Can Be Quantified in Burned Human Skin Using Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography ». *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* 30 (6): 511-17.
- Plavan, V., Giurginca, M., Budrugaec, P., Vilsan, M. et Miu, L. 2010. « evaluation of the physico-chemical characteristics of leather samples of some historical objects from kiev ». *REV.CHIM.(Bucharest)*.
- Plavan, V., Miu, L., Gordienko, I., Ibragimova, A. et Gavriluk, N. 2013. « Determination of the amino acid composition, structure and properties of the archaeological leather before and after restoration ». *Rev Chim* 64: 603-5.
- Poole, P. L. 1994. « The role of hydration in lysozyme structure and activity: Relevance in protein engineering and design ». *Journal of Food Engineering, Water in Foods Fundamental Aspects and Their Significance in Relation to Processing of Foods*, 22 (1-4): 349-65.
- Popescu, C., Budrugaec, P., Wortmann, F.-J., Miu, L., Demco, D.E. et Baias, M. 2008. « Assessment of collagen-based materials which are supports of cultural and historical objects ». *Polymer Degradation and Stability* 93 (5): 976-82.

- R**amaraj, B. 2006. « Mechanical and Thermal Properties of ABS and Leather Waste Composites ». *Journal of Applied Polymer Science* 101 (5): 3062-66.
- Ramundo, J. et Gray, M.. 2009. « Collagenase for Enzymatic Debridement: A Systematic Review ». *Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing: Official Publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society / WOCN* 36 (6 Suppl): S4-11.
- Raspanti, M., Manelli, A., Franchi, M. et Ruggeri, A. 2005. « The 3D structure of crimps in the rat Achilles tendon ». *Matrix Biology* 24 (7): 503-7.
- Reid, Z. et van de Wetering, B. 2012. « Conservation of the sixteenth- and seventeenth-century Chancery pleadings at the National Archives of Ireland ». *Journal of the Institute of Conservation* 35 (2): 189-200.
- Relkin, P. 2006. *Microcalorimétrie à Balayage DSC*. Ed. Techniques Ingénieur.
- Rich, A., et Crick, F. H. C. 1955. « The Structure of Collagen ». *Nature* 176 (4489): 915-16.
- Richard, D., Chevalet, P. et Soubaya, T. 2014. *Mémo visuel de biologie - 2e édition: L'essentiel en fiches*. Dunod.
- Richardin, P., Capderou, C., Flieder, F., Bonnassies, S. et Raison, D. 1988. « Analyse de Quelques Tannins Végétaux Utilisés pour la Fabrication des Cuirs ». In *Les documents graphiques et photographiques: analyse et conservation: travaux du Centre de Recherches sur la Conservation des Documents Graphiques, 1986-1987*, 151-82. La Documentation française.
- Robinson, G. W. et Cho, C. H. 1999. « Role of Hydration Water in Protein Unfolding ». *Biophysical Journal* 77 (6): 3311-18.
- Roblin, V. 1983. « La cicatrisation des plaies cutanées. Contribution à l'étude des plaies du creux antéro-mammaire chez la vache laitière. »

- S**huttleworth, S.G. 1952. « The Mechanisme of Vegetable Tannage ». *Amer. Leather Chemists Assoc., J* 47: 603-22.



- Siebert, K. J., Troukhanova, N. V. et Lynn, P. Y. 1996. « Nature of Polyphenol-Protein Interactions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1): 80-85.
- Singer, A. J., McClain, S. A., Taira, B. R., Rooney, J., Steinhauß, N. et Rosenberg, L. 2010. « Rapid and Selective Enzymatic Debridement of Porcine Comb Burns with Bromelain-Derived Debrase: Acute-Phase Preservation of Noninjured Tissue and Zone of Stasis ». *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association* 31 (2): 304-9.
- Speer, D. P., Chvapil, M., Eskelson, C. D., et Ulreich, J. 1980. « Biological Effects of Residual Glutaraldehyde in Glutaraldehyde-Tanned Collagen Biomaterials ». *Journal of Biomedical Materials Research* 14 (6): 753-64.
- Stevens, A. et Lowe, J. 1997. *Histologie humaine*. De Boeck Supérieur.
- Stoddart, A. 2012. « Enzyme Catalysis ». *Nature Materials* 11 (11): 910-910.

- T**anaka, R., Fukushima, S-I., Sasaki, K., Tanaka, Y., Murota, H., Matsumoto, T., Matsumoto, K., Araki, T. et Yasui, T. 2013. « In Vivo Visualization of Dermal Collagen Fiber in Skin Burn by Collagen-Sensitive Second-Harmonic-Generation Microscopy ». *Journal of Biomedical Optics* 18 (6): 61231.
- Tang, H. R., Covington, A. D. et Hancock, R. A. 2003. « Use of DSC To Detect the Heterogeneity of Hydrothermal Stability in the Polyphenol-Treated Collagen Matrix ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (23): 6652-56.
- Teramura, N., Tanaka, K., Iijima, K., Hayashida, O., Suzuki, K., Hattori, S. et Irie, S. 2011. « Cloning of a Novel Collagenase Gene from the Gram-Negative Bacterium *Grimontia* (*Vibrio*) *Hollisae* 1706B and Its Efficient Expression in *Brevibacillus Choshinensis* ». *Journal of Bacteriology* 193 (12): 3049-56.
- Thomson, R. 2006a. « Testing leathers and related materials ». In *Conservation of leather and related materials*, 58-65.
- Thomson, R.. 2006b. « The Deterioration of Leather ». *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 90 (4): 137.
- Timasheff, S. N. 2002. « Protein-Solvent Preferential Interactions, Protein Hydration, and the Modulation of Biochemical Reactions by Solvent Components ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (15): 9721-26.
- Tornberg, E. 2005. « Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products ». *Meat Science* 70 (3): 493-508.
- Tramper, J., Vermuë, M.H., Beertink, H.H et von Stockar, U. 1992. « Biocatalysis in Non-Conventional Media. » *Elsevier Science Publishers* 8: 764.

- V**an Soest, H.A.B., Stambolov, T. et Hallebeek, P.B. 1984. « Conservation of leather ». *Studies in Conservation* 29: 21-31.
- Viñas, Vicente, et Ruth Viñas. 1992. *Les techniques traditionnelles de restauration: une étude RAMP*. Programme général d'information et UNISIST, Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture.
- Voet, D. et Voet, J. G. 2005a. *Biochimie*. De Boeck Supérieur.
- Vos, A. et Van Vlimmeren, P. J. 1973. « Topographic Differences in Physical properties ». *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 57: 93-98.

- W**ess, T. J. sans.date. « Scientific Approaches to the Evaluation of the Structural Integrity of Historical Documents - A Discussion Paper ».

Wess, T. J et Orgel, J. P. 2000. « Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration ». *Thermochimica Acta* 365 (1–2): 119-28.

**Y**amauchi, M. et Sricholpech, M. 2012. « Lysine Post-Translational Modifications of Collagen ». *Essays In Biochemistry* 52 (mai): 113-33.

Yan, M., Li, B., Zhao, X. et Yi, J. 2011. « Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin ». *Food Hydrocolloids* 25 (5): 907-14.

## Sites internet

---

« Au catalogue des cauchemars : le feu « Essentiam, la maison des Livres Anciens ». 2015. Consulté le juillet 23. <http://www.essentiam.fr/au-catalogue-des-cauchemars-le-feu/#.VbC28vmP-Y9>.

EMA. 2012. « Nexobrid ». <http://www.nexobrid.com/>.

« Il y a 80 ans, les nazis brûlaient les livres des grands intellectuels allemands ». 2015. *Culturebox*. Consulté le juillet 23. <http://culturebox.francetvinfo.fr/livres/essais-documents/il-y-a-80-ans-les-nazis-brulaient-les-livres-des-grands-intellectuels>.


Ménillet, D. et Mordenti, L. 2015. « La peau, chimie et beauté ». Consulté le août 4. <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/>.

Quéré, D.. 2015. « super-hydrophobes ». Consulté le juillet 6. <http://pcsi-2.e-monsite.com/medias/files/surface.pdf>.

« Traduction de “La sauvegarde des fonds de livres”. Bibliothèque Nationale de Lénine. Recueil des travaux scientifiques ». 1978. In , 31-34. Moscou.

# Annexes

## Annexe : protocole de fabrication des cuirs mimosa CM, préparés à façon par l'ICPI

		Title: Vegetable tanned mimosa leather					
		N°: COLL_L_C_M_I				Date: August 2013	
		Origin of material: Calf hide, conserved with salt				Weight:	
		Technician: Marius				Notes:	
Process	%	Product	°C	Dil/°C	Time	pH	Observations
Soaking I	600	Water	20				Static 4 h
Drain float							
Washing	600	Water	20				Over night
Drain float							
Soaking II	600	Water	20				
	4	Salt					
	0.2	Detergent					
Agitation					3 h		
Drain float							
Fleshing							
Liming	400	Water	25				
	4	Lime					
	3	Sodium sulfide					
	0.3	Detergent					
Agitation							2 days static / 30' agitation at the beginning/ 10' agitation 4 times a day
Control							
Drain float							
Washing		Water	20		30'		
Liming II	400	Water	25				
	4	Lime					12 hours static
Drain float							
Washing		Water	20		30'		
Fleshing							
Washing		Water	30		30'		
Deliming	150	Water	28				
	3.5	Ammonium sulfate					
Agitation					60'		
Control							
Washing		Water	40		30'		
Bating	150	Water	38				
	1	Sama Type B					
Agitation					2h		
Control							
Process	%	Product	°C	Dil/°C	Time	pH	Observations
Degreasing	100	Water	35				
	0.3	Detergent					
Agitation					10'		
	200	Water	35				
Agitation					10'		
Washing		Water	35		15'		

Pickling	100	Water	25				
	6	Salt					
Agitation					15'		
	0.6	Formic acid					
Agitation					60'		
	0.6	Formic acid					
Agitation					60'		
	0.8	Formic acid					
Agitation					60'		
							Static over night/next day 30' agitation
Control							
Tanning	120	Pickling float	35			3.5-4	
	10	Mimosa					
Agitation					2h		
Control							
Drain float							
	10	Mimosa					
Agitation					210'		
							Static over night
Control							
Drain float							
		Sodium bicarbonate			30'	4-4.2	
							Static over night
Drain float							
							Static 48h
Washing	300	Water	30		10'		
Cleaning	200	Water	30				
	0.5	Oxalic acid					
Washing	300	Water	30		10'		
	200	Water	30				
	0.5	Sodium bicarbonate					
Drain float							
Neutralization	300	Water	30				
Drain float							
<b>Process</b>	<b>%</b>	<b>Product</b>	<b>°C</b>	<b>Dil/°C</b>	<b>Time</b>	<b>pH</b>	<b>Observations</b>
Washing	200	Water	45				
Retanning	5	Mimosa			40'		
Drain float							
Greasing	200	Water	45				
	8	Oil type natural			40'		
	0.3	Formic acid					
Control							
Drain float							
Rinse	300	Water	20		5		
Stretched to frame dryer							

## Annexe : protocole de fabrication des cuirs STEP, au mimosa (CM STEP) et au sumac (CS)

Les peaux de veau, achetées dans une tannerie en condition de salage humide ont été sélectionnées selon leur poids (8-10kg) et leur aire (12-15 sq.ft.). elles ont ensuite subi un processus de chaulage, déchaulage et décapage selon les méthodes expérimentales décrite dans le tableau ci-dessous.

A la fin de la transformation des peaux en cuir, les cuirs ont été nourris avec de l'huile de pied de bœuf émulsionnée avec un émulsifiant non ionique puis mis à sécher.

Raw Materials:	Six raw slaughtered large calf/veal 12 -15 sq. ft. in a salted state.
Tanning Material:	Pure sumac leaf (Turkey). Dritan mimosa extract of low sulphite (Hodgson Chemicals).
General Processing Conditions:	Mild processing conditions (static or low drum speeds) to minimise looseness and drawn grain.
Preparation (% on hide wet salted weight):	Float 250 – 300% at 20°C 1/2hr. Drain and wash off in running water.
Main Soak:	Refloat 300% at 22 – 25°C. Continuous soak over 2 days with minimum mechanical action for initial 20 minutes then 20 minutes prior to draining and washing off. 1% chloros added to control bacteria.
Flesh:	Skins fleshed mechanically in a fleshing machine. Individual weights recorded: Total wt = 76 kg.
Lime:	Float 300% water at 22 – 25°C. 1% sodium hydrosulphide + 3% lime. Ran for 20 minutes. Added: 1% sodium sulphide + 3% lime. Ran for 20 minutes. Added: 1% sodium sulphide. Ran for 30 minutes, then rested. Ran intermittently for 5 minutes per hour. Left overnight. Ran next day 15 minutes to ensure unhairing complete. Added 0.5% sodium sulphide. Ran 5 minutes in 20 minutes. Total wt = 94 kg.
Relime:	Float 300% at 20°C. Added: 5% lime. Left on overnight and ran 5 minutes per hour.
Sample:	Samples taken from skins for collagen analysis.
Delime:	1. Washed off in water at 400% float at 32°C for 15 mins. 2. Drained and repeated. 3. Float 300% at 35°C. 4. Added 1% NH <sub>4</sub> Cl for 60 minutes. pH of liquid = 9.6. cut pp 75%. 5. Added 1% NH <sub>4</sub> Cl for 60 minutes. pH of liquid = 9.3. cut pp 100%.
Bate:	1. Float 300% water at 37°C. 2. Added 1% Pancreol Bate LPB for 25 minutes.
Wash and drained:	Water at 20°C for 15 minutes.
Scud:	Hand scudded over beam and grain hosed. Left overnight in bath of water at 20°C + 0.2% antimould A5.
Pickle:	1. Float 100% water at 20°C + 5% NaCl for 5 minutes. Added 0.2% lactic acid (1:10). Run for 60 mins = pH 5.7. Allowed to rest for 60 mins. 2. Added 0.2% lactic acid (1:10). Ran for 60 mins = pH 4.9. Allowed to stand for 120 mins. Then ran for 30 mins. Total time of pickle: 195 minutes.
Drained:	
Mimosa Tannage:	1. 25% water at 20°C + 1% antimould A5 and 5% mimosa. Allowed

	<p>to run for 30 minutes.</p> <p>2. Added 10% mimosa. Run for 60 minutes.</p> <p>3. Added final 10% mimosa and run until tannage penetrated. Final T. of 84°C.</p> <p>4. Washed in 200% water at 35°C then drained &amp; horsed up. Total mimosa added: 25%.</p>
Sumac Tannage:	<p>1. 70% water at 20°C 2% Na Acetate + 0.1% antimould A5. Run for 15 minutes. then 3% sumac leaf in 10% water at 35°C + 0.1% A5 mixed and allowed to cool. This then added to drum.</p> <p>2. Five further additions of sumac added 10 drum.</p>
Samm:	Excess water removed by pressing in a machine.
Set:	Skins set out by machine to achieve smooth grain.
Split at 2mm:	Band knife splitter.
Shaved at 1.6/1.7mm:	Flesh side shaved to give 1.6 - 1.7mm wet substance.
Horsed up:	
Washed off:	Water at 35°C for 60 mins.
Cleared:	<p>Iron particles removed with:</p> <p>1. 100% at 35°C plus 0.5% Oxalic acid for 30 mins.</p> <p>2. 0.5% oxalic added, ran until clear.</p>
Washed off:	Water at 35°C.
Mimosa Retannage:	100% water at 35°C + 10% mimosa for a few hours.
Sumac Retannage	80% water at 35°C + 20% sumac mulch for a few hours.
Fat Liquor:	<p>1. 200% water at 40°C + 3% Neatsfoot oil compound emulsion (Neatsfoot oil compound 95% oil + 5% KTU Nonionic detergent.</p> <p>2. Run for 60 minutes.</p> <p>3. Rest for 4 hours.</p> <p>4. Run for 20 minutes.</p>
Drained and Horsed up over 2 days:	
Sammed and Set:	
Toggled up to Air Dry:	

## Annexe : électrophorèse – SDS PAGE méthode LAEMMLI

Gels (Acrylamide/Bis-acrylamide 37.5:1 40%)

- ❖ Running gel (gel de séparation) : volume 10 ml pour 2 gels de 0.75mm/1gel de 1.5mm :

%	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	15%
Acryl/bis 40% (37.5 :1)	1.5ml	1.75ml	2ml	2.25ml	2.5ml	2.75ml	3ml	3.75ml
Tris HCl 1.5M pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
SDS 10% (m/v)	100µl	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
ddH2O	5.9ml	5.65ml	5.4ml	5.15ml	4.9ml	4.65ml	4.4ml	3.65ml

- ❖ Stacking gel (gel de concentration) (40% acryl/bis)

solutions	2 gels	1 gel
Acryl/Bis 40% (37.5 :1)	1ml	0.5ml
Tris –HCl 0.5M pH 6.8	2.5ml	1.3ml
SDS 10% (m/v)	100µl	50µl
Dd H2O	6.4ml	3.2ml

Juste avant de couler chaque gel ajouter le catalyseur et l'initiateur :

	Temed	APS 10% (m/v)
Stacking gel	10µl	50µl
Running gel	10µl	50µl

Les volumes d'APS (ammonium persulfate) peuvent être doublés afin d'accélérer la vitesse de polymérisation du gel.



## CHARACTERIZATION OF THE EFFECT OF HEAT ON VEGETABLE TANNED LEATHER AND RESTORATION TRIALS THROUGH ENZYMATIC PROCESSES

ELEONORE IZQUIERDO<sup>1,2</sup>, LAURIANNE ROBINET<sup>2</sup>, MICHEL BOISSIERE<sup>1</sup>, BERTRAND  
LAVEDRINE<sup>2</sup>, VERONIQUE LARRETA-GARDE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extra-cellulaire Cellule (ERRMECe) University  
of CergyPontoise 2 avenue Adolphe Chauvin 95300 CergyPontoise, France,  
[eleonore.izquierdo@u-cergy.fr](mailto:eleonore.izquierdo@u-cergy.fr), [michel.boissiere@u-cergy.fr](mailto:michel.boissiere@u-cergy.fr), [veronique.larreta-garde@u-cergy.fr](mailto:veronique.larreta-garde@u-cergy.fr)*

<sup>2</sup>*Centre de Recherche sur la Conservation des Collections, CRC-CNRSUSR322 MNHN, 36 rue  
Geoffroy Saint Hilaire 75005 Paris, France,  
[laurianne.robinet@mnhn.fr](mailto:laurianne.robinet@mnhn.fr), [lavedrin@mnhn.fr](mailto:lavedrin@mnhn.fr)*

The research aims to develop a new restoration approach for leather in cultural heritage having lost its flexibility after exposure to heat. The characterization of heat-damaged leather was performed by various technics such as Dynamic Mechanical Analysis (DMA) and contact angle measurement. Heat causes darkening, mass loss, shrinkage, stiffness increase and renders leather non wettable. Part of these changes can be due to an aggregation of leather proteins as a result of heat exposure. An innovative method relying on the use of biological molecules was developed in order to respect the nature of the object and preserve its past and future. Enzymes such as hydrolases able to break the protein aggregates have been used. One of the challenges was to provide water necessary for the enzyme activity without wetting the leather surface to avoid further damage of the leather. Several procedures were tested and compared to decrease water availability/activity, and first promising results were obtained with an enzymatic emulsion allowing a flexibility gain of about 20% of heated leathers. Moreover the efficiency of the enzyme in this treatment has been demonstrated. Attempts to restore will be pursued in this direction.

Keywords: leather – heat – enzymes

### INTRODUCTION – BACKGROUND AND HYPOTHESIS

The research project "BIORESTOCUIRS" focusses on leather artifacts in cultural heritage, such as book covers, having been exposed to extreme temperatures. Exposure to heat during a fire is especially devastating and has for consequence to turn the items non-handable because they are too rigid and fragile. This results in the loss of all or a part of the history of these heritage objects, witnesses of the past. The first goal of this project is to characterize the modifications induced to leather after exposure to heat in order to understand at various scales consequences of heat exposure. The second objective is to elaborate an innovative treatment to restore leather initial properties, including its flexibility.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

Different new calf leathers tanned with vegetable sumac (hydrolysable) or mimosa (condensed) tannins were used for the experiments. Artificially altered samples were prepared by exposing the leather to dry heat at 160°C for 4 days.

#### Characterization methods

To quantify the loss of flexibility after exposure to heat and the efficiency of the restoration treatment, dynamic mechanical analysis (DMA) was performed using a DMA Q800 (TA instrument) in tensile and frequency sweep mode between 0.5 and 60Hz at room temperature, under a controlled strain of 0.05 % and 0.01N static force; specimens are placed in the direction head-tail.

To determine the consequences of heat exposure on water absorbency, leather samples (unheated and heated) were immersed in pure water. Before and during the measurement (each hour), samples were weighted until an equilibrium state is reached.

To determine the sample surface hydrophobicity and wettability, a goniometer is used. A droplet of water (15 $\mu$ L) is deposited on the leather sample surface (grain side) and the droplet behaviour on the support is recorded. Contact angle value ( $\theta_E$ ) is determined by the software “Drop Shape Analysis”. Material is defined as hydrophobic when  $\theta_E$  is superior to 90° and wettable if the droplet can penetrate the material within 3 minutes.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization of modifications induced to leather after exposure to heat

Following the exposure to heat, shrinkage and darkening of the sample were both observed at a macroscopic scale

Dynamic mechanical analysis (DMA) was performed to quantify the loss of flexibility after exposure to heat as shown in figure 1.

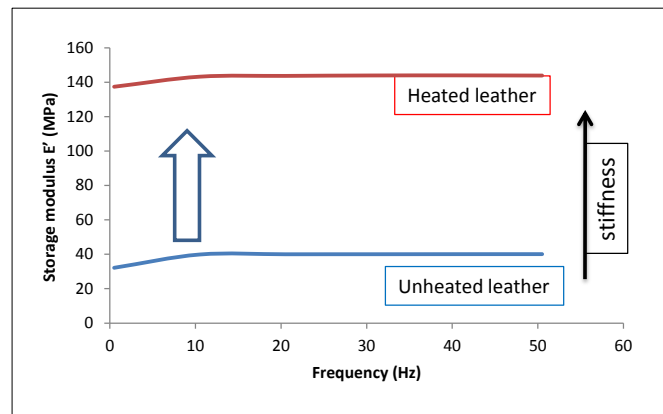


Figure 1 . Storage modulus of an unheated leather and a heated leather as a function of frequency.

The results show a large increase of the storage modulus (up to about 260%) after exposure to heat correlated with an increase in leather stiffness. Considering that one of the main objective of the restoration treatment is to restore leather flexibility, this method will be essential in evaluating the efficiency of the treatment.

Because the restoration treatment has to be applied on the surface through an aqueous solution, the wettable and absorbency properties of the leather with water has to be determined. The contact angle, wettability and water absorbency measurement are shown in figure 2.

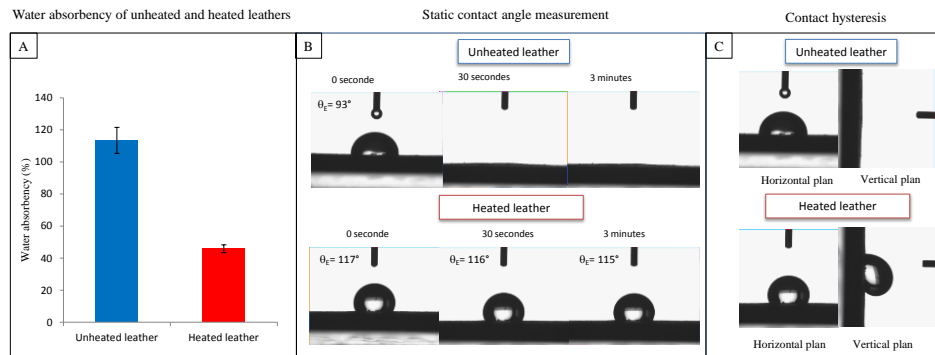


Figure 2. Water absorbency [A], hydrophobicity measurement and wettability in static mode [B] and contact hysteresis observation in dynamic mode[C] of unheated and heated leather.

Results highlight that water absorbency has decreased in the heated leather compared to the unheated one (fig.2[A]). Contact angle measurement and wettability, show that after exposure to heat leather becomes more hydrophobic, with  $\theta_c > 90^\circ$ , and also non wettable, as the droplet does not penetrate into the leather within 3 minutes (fig.2[B]). This variation could be due to heat-induced chemical modifications of leather components, i.e. heated proteins are usually more hydrophobic than native ones [Baldwin (1986)]. These results could also be attributed to the increase in rugosity after heat exposure; as shown in figure 2[C]. The droplet does not flow from the vertical surface, this “lotus effect” is due to a large rugosity at the nano- or micrometric scale. This result also predicts probable difficulties for our restoration treatment to penetrate inside the heated leather.

As largely demonstrated in literature, heat provokes protein aggregation [Wallace *et al.* (1986)]. Our observations of the macroscopic properties of heated leather are in good agreement with this phenomenon. Moreover, sequential extraction experiments have revealed that some proteins (i.e. fibronectin) cannot be solubilized, even in denaturing solutions (urea, sodium hydroxide) after heating, while they are extracted before heating (data not shown). This indicates that exposure to heat leads to a rearrangement of the leather proteins.

Restoration trials

The restoration treatment is based on the use of enzymes to hydrolyze protein aggregates formed after heat exposure. Water is absolutely essential for enzyme activity; allowing it to preserve its active three-dimensional structure and the flexibility necessary for the catalytic process; but water also has a damaging effect on leather having been exposed to heat. Thus, the treatment should provide water for the enzyme while limiting the amount of water interacting with leather. Indeed, the shrinkage phenomena, the stiffness and the darkening observed after exposure to heat are strongly accentuated in case of contact with water, as may be the case in a fire, as shown in figure 3[A].

First, the direct action of an enzyme in aqueous solution was attempted. The idea was that the enzyme action on protein aggregates could be fast enough to counteract the effects of the water on leather. The enzymatic solution in buffer (water as control, data not shown) represents the optimal environment for the enzyme as pH value can be chosen and enzyme regulators added. Moreover, in such media thermodynamic water activity ( $a_w$ ) reflecting the water availability for the reaction is close to 1 which is optimal for protease hydrolysis activity [Clerjon *et al.* (2003)]. With this approach, a very strong shrinkage of the heated sample (fig.3[B]) was observed showing that the enzymatic activity, in aqueous solution, does not permit to avoid the leather retraction.

To reduce the water supply to the leather surface, restoration tests were undertaken by application of enzymatic polysaccharide gels. In this case, water is largely present but the gel network prevents it to flow. The water activity is not lowered (from 0.91 to 1) but water is “locked” by the polysaccharides, being both physically contained in and having strong interactions with the biopolymer network. Thus gels represent a suitable media for enzymes. However, results show again a considerable shrinkage of the heated leather (fig.3 [C]), but to a lower extent than in the previous attempts.

To further reduce the water content, a water soluble co-solvent (glycerol), acting as a thermodynamic water activity depressor was used to prepare new enzyme solutions. In this case, water creates many links with the co-solvent, which reduces its availability to interact with the leather. Water activity is strongly reduced, decreasing from 0.96 in 1 M glycerol solution to 0.61 in 10 M glycerol solution. The counterpart of this phenomenon is the large decrease in enzyme activity. For a protease, the enzymatic efficiency is reduced by 35% for 1 M glycerol solution and up to 99% for 9 M glycerol solution as compared with the usual buffer medium [Hertmanni *et al.* (1991)]. Several concentrations of co-solvent were tested (fig.3[D]). At low co-solvent concentration (1M glycerol) shrinkage is still observed but to a lower extent than with polysaccharides gels. At high co-solvent concentrations (10 M) no retraction of the heated leather is observed, but no significant gain in flexibility occurred, probably due to the low or null enzyme activity. Moreover, this treatment causes a coloration of the unheated leather.

The last approach consisted in the application on the leather surface of an enzymatic emulsion composed of an aqueous phase, in which the enzyme is introduced, and a hydrophobic phase to facilitate the introduction of the enzyme on the hydrophobic leather surface. In this particular phase structuration, water is available ( $a_w$  varies from 0.91 to 0.95) for the enzymatic reaction, but due to the medium compartmentalization, it is in low contact with the leather surface.

In first trials with the enzymatic treatment (fig.3 [E]) no coloration of the unheated leather neither shrinkage of the heated leather were observed.

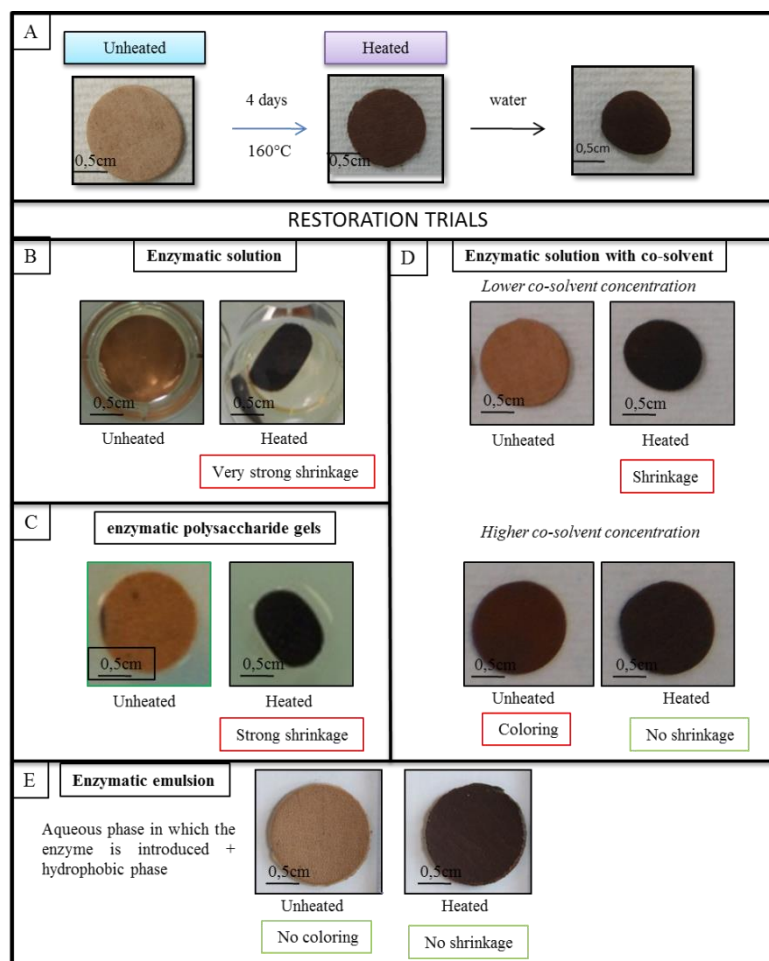


Figure 3 . Degradation of a leather exposed artificially to heat, and then placed in contact with water [A]. Enzymatic restoration treatments tested on heated leather and on unheated leather as a control, [B] to [E].

Moreover dynamic mechanical analysis (DMA) performed on heated leather treated with the enzymatic emulsion highlighted a flexibility gain. Three days after the application of the enzymatic treatment, a decrease of the storage modulus was observed

corresponding to about 30% of flexibility gain as shown in figure 4[A]. This flexibility gain is well due to the enzymatic reaction since only 5 % gain is measured with the emulsion alone (without enzyme) as shown in figure 4[B].

Comparison of the flexibility gain between enzymatic and non enzymatic treatment

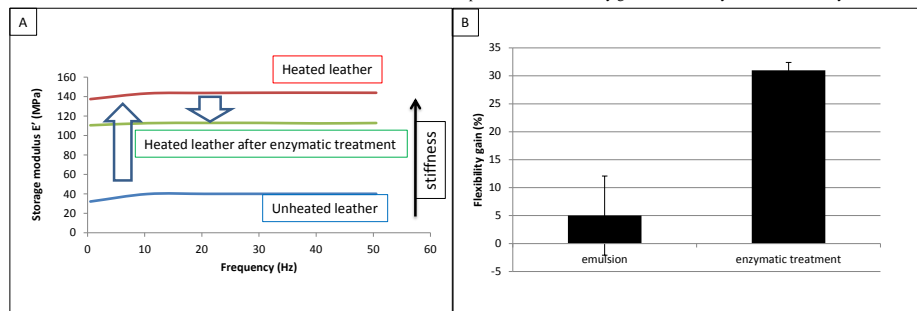


Figure 4 . [A] Storage modulus as a function of frequency for unheated leather, leather after exposure to heat and the same sample after enzymatic treatment . [B] Flexibility gain (%) after application of emulsion without enzyme and enzymatic treatment.

## CONCLUSION

Results obtained through the physic chemical and biochemical characterization of heated and unheated leathers highlight a modification of the leather at various scales. At a macroscopic scale, exposure to heat induces a darkening of the sample combined with a stiffness increase and changes in the surface hydrophobicity, wettability and rugosity as well as in water absorbency. All these parameters support a protein aggregative process. During the restoration trials, aiming to break the protein aggregates using hydrolases, various processes were tested to bring the enzyme to the leather surface. All results obtained during restoration tests highlighted the need to limit the interaction between water, whose presence is essential for the action of enzymes, and leather. The use of an emulsion where the enzyme is in an active form but water in low contact with the leather surface has given promising results. No coloration of the leather was observed while a gain in flexibility was obtained. This restoration technique appears promising. Work will continue in this direction.

## ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the LabEx PATRIMA for funded this research project, The LPPI laboratory for permitting us to do experiments.

## REFERENCES

- Baldwin R.L. (1986), temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding, proceedings of the national academy of sciences, volume 83, pages 8069-8072
- Clerjon S., Daudin J-D., Damez J-L. (2003), water activity and dielectric properties of gels in the frequency range 200MHz-6GHz, Food chemistry, volume 82, pages 87-97
- Hertmanni P., Picque E., Thomas D. and Larreta-Garde V. (1991), Modulation of protease specificity by a change in the enzyme microenvironment : selectivity modification on a model substrate, purified soluble proteins and gluten, FEBS Letters, volume 279 (issue 1), Pages 123–131
- Wallace D- G., Condell R. A., Donovan J. W., Paivinen A., Rhee W. M. and Wade S. B. (1986), Multiple denaturational transitions in fibrillar collagen, Biopolymers, volume 25 (issue 10), pages 1875–1893